



TITLE:

錐体と桿体の光受容蛋白質の機能
発現調節機構(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

今井, 啓雄

CITATION:

今井, 啓雄. 錐体と桿体の光受容蛋白質の機能発現調節機構. 京都大学,
1996, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1996-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3110488>

RIGHT:

学位申請論文

錐体と桿体の光受容蛋白質の
機能発現調節機構

京都大学大学院理学研究科

今井啓雄

目次

序章 錐体と桿体の光受容蛋白質	1
1-1 錐体と桿体	2
1-2 視細胞内の情報伝達過程	4
1-3 光受容蛋白質	6
1-3-1 基本構造	6
1-3-2 錐体と桿体の光受容蛋白質	8
第二章 試料と方法	13
2-1 試料の調製	14
2-1-1 材料と緩衝液	14
2-1-2 ニワトリ網膜からの光受容蛋白質の調製	15
2-1-2 光受容蛋白質変異体の調製	21
2-2 測定方法	24
2-2-1 光受容蛋白質の分光学的定量と吸収極大波長の決定	24
2-2-2 従来型低温分光法	26
2-2-3 時間分解低温分光法	27
2-2-4 再生速度の測定方法	28
第三章 錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質	31
3-1 光受容蛋白質の再生速度	32
3-2 光受容蛋白質の光化学的性質	34
3-2-1 光受容蛋白質の分子吸光係数（発色団周辺の静的構造）	34
3-2-2 光受容蛋白質の光感受性（発色団周辺の動的構造）	36
3-3 光受容蛋白質の光退色過程	38
3-3-1 バソ中間体（発色団の異性化反応）	38
3-3-2 バソ中間体からルミ中間体へ（発色団周辺の局所的構造変化）	40
3-3-3 ルミ中間体からメタI中間体へ（発色団から蛋白質全体への情報伝達）	42
3-3-4 メタI中間体からメタII、メタIII中間体へ（酵素活性機能の発現と停止）	44
3-4 錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違い	52

第四章	両者の性質の違いを生み出す分子内の機構	55
4-1	構造変化の活性化エネルギー	56
4-2	構造変化の速度に対するpHの効果	58
4-3	錐体光受容蛋白質の性質を持つ部位特異的変異ロドプシンの作成	60
4-3-1	部位特異的変異部位の選択	60
4-3-2	部位特異的変異ロドプシンの吸収スペクトル	62
4-3-3	部位特異的変異ロドプシンのメタII中間体	64
4-3-4	部位特異的変異ロドプシンの再生速度	66
4-4	両者の性質の違いを生み出す分子内の機構	68
第五章	光受容蛋白質の機能発現機構	69
5-1	光受容蛋白質の性質と視細胞の特性の関係	70
5-1-1	再生速度と順応過程の相関	70
5-1-2	活性化光受容蛋白質の寿命と視細胞の光感受性の相関	72
5-2	光受容蛋白質の分子内機能発現機構	74
5-2-1	光受容蛋白質の機能発現機構の分化と進化	74
5-2-2	今後の展望	
	「なぜ、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の機能発現速度は異なるのか」	76
	謝辞	78
	参考文献	79

本研究で用いた略号および用語

光受容蛋白質に関係した略号および用語

Green	ニワトリ <u>緑</u> 色感受性錐体光受容蛋白質 (Chicken Green)
Red (Iodopsin)	ニワトリ <u>赤</u> 色感受性錐体光受容蛋白質 (Chicken Red)
Blue	ニワトリ <u>青</u> 色感受性錐体光受容蛋白質 (Chicken Blue)
Violet	ニワトリ <u>紫</u> 色感受性錐体光受容蛋白質 (Chicken Violet)
Rhodopsin	ニワトリ桿体光受容蛋白質 (Chicken Rhodopsin)
オプシン	光受容蛋白質のアポ蛋白質

その他の略号および用語

α -MM	α -methyl-D-mannoside
cGMP	cyclic GMP
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CM	carboxymethyl
ConA	concanavalin A
DEAE	diethylaminoethyl
DTT	dithiothreitol
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
KIU	kallilrein inhibitor units
OD	optical density
PC	L-a-phosphatidylcholine from fresh egg yolk
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
SP	Sulfopropyl

序章

錐体と桿体の光受容蛋白質

普段、テレビを見ていると、我々ヒトの視覚系がどんなテレビカメラよりも高性能であることに気づくであろう。心理学的、電気生理学的研究によると、その理由は、特性の異なる二つの並列した視覚系が存在することにあるという。これを視覚の二元説という。普段、我々は無意識のうちにこの二つの視覚系を使い分けており、両者の違いを意識したことはない。ところが、我々の体の中では、驚くべき精緻な仕組みが、この二元説を支えているのである。特に、光情報を神経的電気信号に変換する視細胞のレベルで既に、両視覚系の光に対する応答特性が異なっている。本論文では、両者の違いをさらに遡り、情報伝達系の最上流に位置して、光情報を酵素活性に変換する光受容蛋白質の性質について、どこが同じでどこが異なるのか、順次検討してゆくことにする。また、さらに光受容蛋白質の分子内に立ち入り、その性質の違いがどのようなメカニズムで現れるのか検討してみたい。

1-1 錐体と桿体

多くの脊椎動物の視覚は、薄暗いところで明暗を感じる薄明視（桿体）系と、明るいところで働き、色識別を行う昼間視・色覚（錐体）系の、二つの伝達系により担われている。薄明視に関与する視細胞である桿体（Rod）は、その名のとおり棒状の外節を持つ細胞であり、外節の円板膜に光受容蛋白質であるロドプシン

（Rhodopsin）が存在している（図1-1）。一方、昼間視および色覚に関与する視細胞は錐体（Cone）であり、その外節は円錐状をしている。また、外節の形質膜は折り畳まれた構造を取っていて、その中に光受容蛋白質（Cone Pigment）が含まれている。網膜には数種類の錐体が存在し、それぞれが波長感受性の異なる光受容蛋白質をもつ。網膜に入射した光は、これらの錐体によって違った割合で吸収されるので、それらの情報が統合されて色覚が生じるのである。

細胞のレベルでは、電気生理学的な知見から、桿体と錐体の光応答特性に大きな違いがあることが見いだされた（Pugh & Cobbs, 1986; Schnapf & Baylor, 1986）。それを表1-1に示す。

錐体は、明るい光環境で効率よく多くの情報を得るために、光感受性は低い、応答の速い特性を持っている。また、様々な光環境に対応するためにダイナミックレンジが広く、順応速度も速い。一方、桿体は薄暗い光環境で働くため、応答は遅いが光感受性の高い特性を示す。このような両者の応答特性の違いが、視覚の二元説を成り立たせているのであるが、このような特性の違いが発現する原因は未だ解明されていない (Yau, 1994)。一つの説は、視細胞の形態にあるという説であるが、今までに視細胞の応答特性の違いを、形態の違いを基にして満足に説明する理論は出現しなかった。もう一つの説として、細胞内の情報伝達機能が異なることが原因であることが考えられるが、これには実験的な検証が必要である。そのため、視細胞内の情報伝達機構の研究は多くの研究者を魅了し、先駆的な研究が行われてきた。

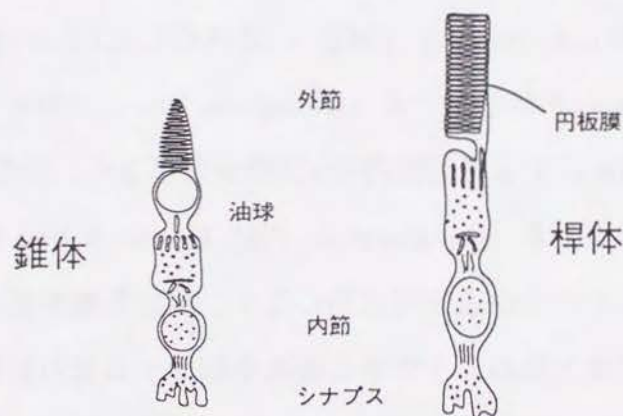


図1-1 ニワトリの錐体（単一錐体）と桿体

表1-1 錐体と桿体の光応答特性の違い

視細胞	錐体	桿体
役割	昼間視・色覚	薄明視
応答	速い	遅い
光感受性	低い	高い
暗順応の速さ	速い	遅い
ダイナミックレンジ	広い	狭い

1-2 視細胞内の情報伝達過程

ウシなどの哺乳類の多くは、錐体よりも圧倒的に多数の桿体を持っている。視細胞の生化学的な研究は、ウシなどのように、材料として入手しやすい動物を対象としてきたため、現在まで、桿体を中心とした研究が進められてきた。一方、最近の分子生物学的技術の進展により、遺伝子解析の方向からの錐体の情報伝達過程の研究も急速に発展している。その結果、両者の細胞内情報伝達は相同の蛋白質群によって担われていることがわかってきた。

現在までに解明されている視細胞内の光情報伝達過程を図1-2に模式的に示した。光受容蛋白質は光を受けるとそのエネルギーを使って構造変化を起こし、G蛋白質トランスデュースインと結合して α サブユニット ($T\alpha$) (Lerea et al., 1986) を他のサブユニット (Lee et al., 1992; Ong et al., 1995) から解離させ、活性化させる (Fung et al., 1981; Bennet et al., 1982)。活性化した $T\alpha$ はPDE (cGMP phosphodiesterase) を活性化する (Gillespie & Beavo, 1988; Li et al., 1990)。そして、活性化されたPDEによって細胞内のcGMPが分解され、形質膜に存在するcGMP依存性チャネルが閉鎖する (Fesenko et al., 1985; Haynes & Yau, 1985; Bonigk et al., 1993)。こうして細胞が過分極状態になり、細胞興奮が起こるのである。

また、最近では上記のような中心経路を制御する蛋白質群も発見されつつある (Kühn, 1984; Palczewski et al., 1988)。ところが、中心経路についても、制御系についても、桿体と錐体の応答特性の違いを説明できるような蛋白質の種類の違いは未だ発見されていない。そこで、次に考えられる可能性として、桿体と錐体の相同な蛋白質の性質が異なることが考えられる。現在、多くの研究者が、この可能性の検証を行っている真っ最中である (Gillespie & Beavo, 1988; Fukada et al., 1989, 1990; Bonigk et al., 1993; Picones & Korenbrot, 1995)。本論文では、光情報を酵素活性に変換することにより、情報伝達系の最上流に位置する光受容蛋白質の性質について、桿体と錐体の違いを検討してゆきたい。

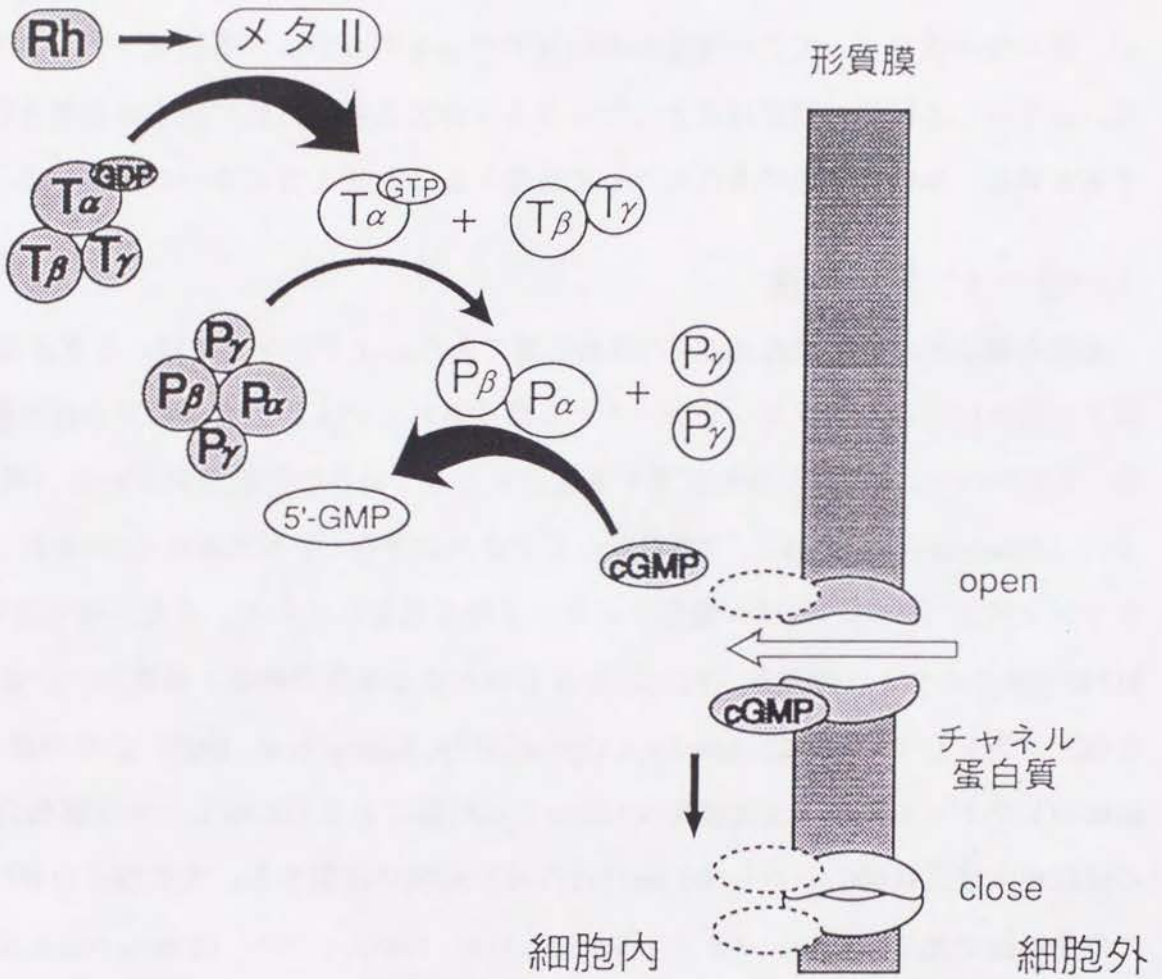


図 1-2 視細胞内の分子間情報伝達機構

光受容蛋白質が光を受容すると、黒矢印で表されるように酵素カスケード系が働く。例として、今までに研究が比較的進んでいる桿体内の情報伝達機構を示した。太い矢印は増幅過程を示す。網がけは暗状態、白抜きは明状態の各分子の様子。Tはトランスデュシン、PはPDEを表す。光受容蛋白質以外は、数種類のサブユニットからなる蛋白質である。

1-3 光受容蛋白質

視細胞の興奮は、光受容蛋白質が光を受容することから始まる。それゆえ、光受容蛋白質の光刺激受容における挙動と、それに伴う構造変化過程、そしてトランスデューシンへの情報伝達機構は視細胞の働きのなかで重要な意味を持つ。現在までに、様々な手段によってこの光受容蛋白質の構造を明らかにする研究が行われてきた。以下に、本研究で研究対象としたニワトリの光受容蛋白質に関する知見を紹介すると共に、本研究を始めるにあたって基礎となった考え方について記述する。

1-3-1 基本構造

光受容蛋白質は分子量約40,000の膜蛋白質であり、オプシンとよばれるアポ蛋白質と、発色団である11シスレチナールから構成されている。アポ蛋白質の高次構造は、7本の α ヘリックスが膜を貫通する構造をとっていると推定されている（図1-3）（Schertler et al., 1993）。7番目のヘリックスに存在し、N末端から296番目にあるリジン残基（K296）には、発色団がシッフ塩基結合している。また、発色団は113番目のグルタミン酸残基（E113）をはじめとする周囲の残基と静電的、立体的な相互作用をしている（Zhukovsky & Oprian, 1989; Sakmar et al., 1989）。その結果、遊離のレチナールの吸収極大波長は380nmと紫外部にあるのに対し、光受容蛋白質の吸収極大波長は400 nmから600 nm付近の可視領域に位置する。光受容蛋白質は、この発色団で光を吸収し、フォト（Shichida et al., 1984）、バソ（Yoshizawa & Kitô, 1958; Yoshizawa & Wald, 1963）、ルミ（Hubbard et al., 1959）、メタI-III（Matthews et al., 1963）と呼ばれる中間体を経由して、最終的にアポ蛋白質と発色団が解離する。この中で、メタII中間体がトランスデューシンと結合することが報告されている（Fukada & Yoshizawa, 1981; Konig et al., 1989; Kibelbek et al., 1991）。発色団を固定するK296とE113、および、トランスデューシンと相互作用する部位は、それぞれ情報の受容と伝達という、光受容蛋白質の基本的な機能を担う上で重要な部位である。そのため、その配列は脊椎動物の光受容蛋白質間で非常に高い確率で保存されている。一方、その他の部位は光受容蛋白質の様々な性質を変化させ、その多様性を担っている部分といえよう。

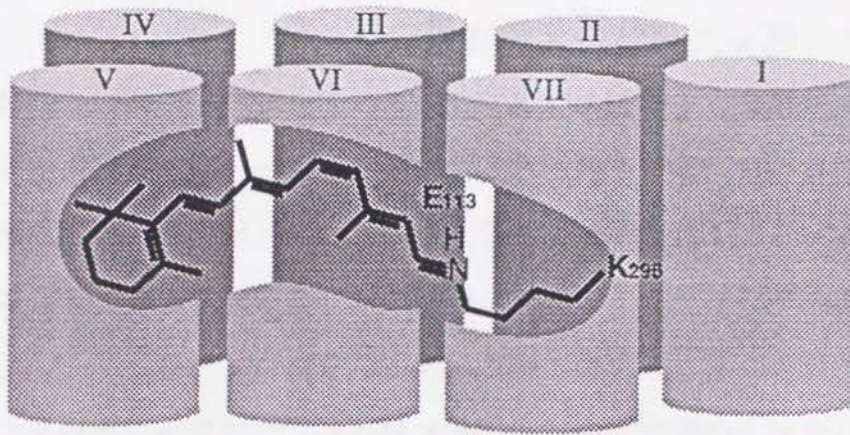


図 1-3 ロドプシンの推定される高次構造 (吉澤と今元, 1992)

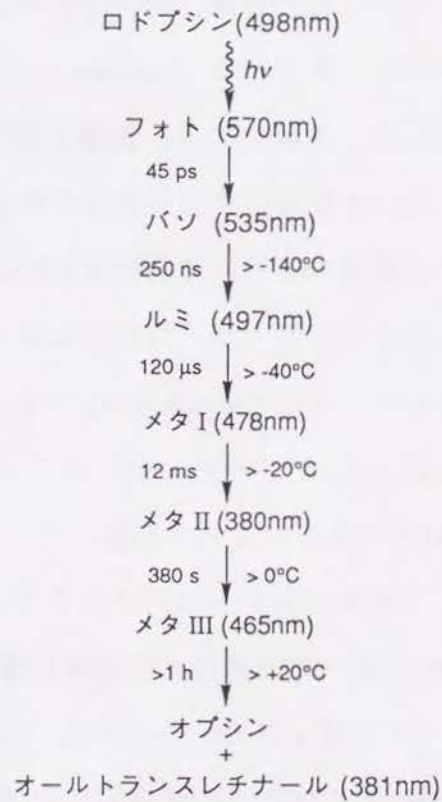


図 1-4 ウシロドプシンの光退色過程

各中間体と、その吸収極大波長、そして反応の経路が示されている。波矢印は光反応を表し、直線の矢印はその後の熱反応を表している。生成、崩壊の速度のパラメータとして矢印の右側に反応の遷移温度 (第 2 章参照) が、また左側に時定数が示されている。

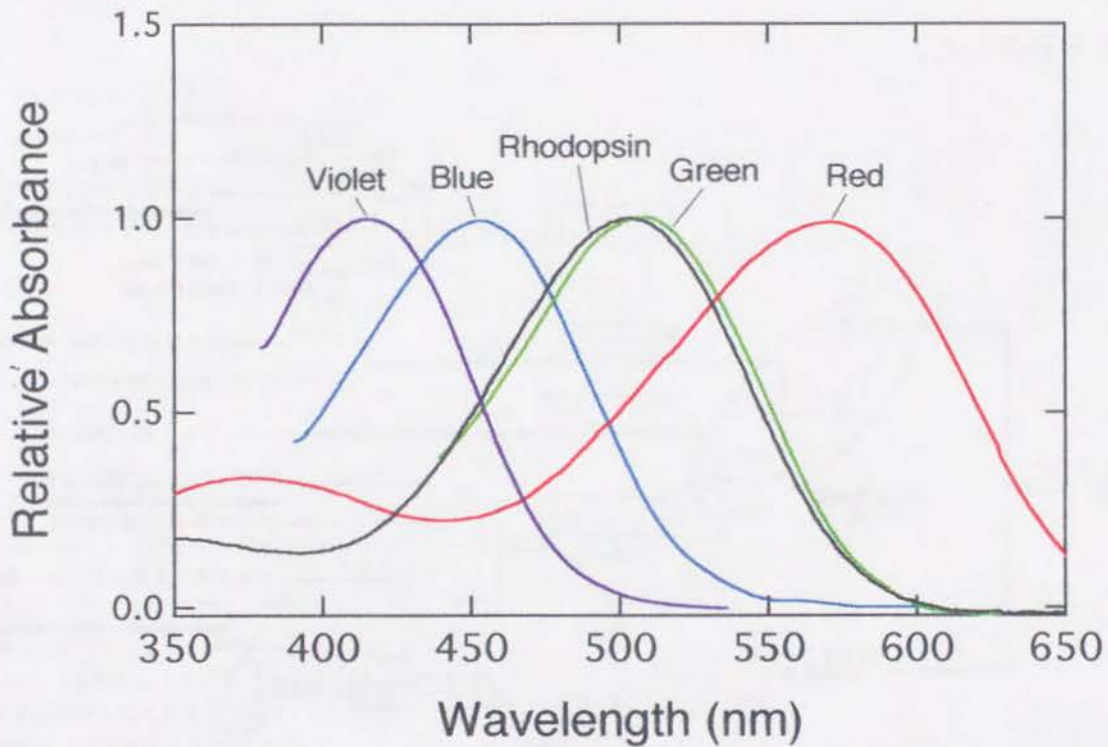
1-3-2 錐体と桿体の光受容蛋白質

ニワトリの網膜には1種類のロドプシンと、赤、緑、青、紫色に波長感受性をもつ錐体光受容蛋白質（以下それぞれRed、Green、Blue、Violetと記述する）が含まれている（図1-5）。錐体が色覚を担うため、ニワトリの色覚は4原色からなっていると考えられている。ヒトの場合は周知の通り3原色である。これは、赤、緑、青色に波長感受性をもつ3種類の錐体が存在するためである。

光受容蛋白質の多様性の方向は、大きく分けて二つである。そのひとつは、本研究の目的となっている錐体と桿体の光受容蛋白質の性質の違いであり、もう一つは、錐体光受容蛋白質間での吸収スペクトルの違いである。前者が視覚の二元説を担うのに対して、後者は色覚の分子的な基盤を形成している。最近、主にヒトの錐体光受容蛋白質の遺伝子解析により、この分化は、発色団の周辺のアミノ酸残基の置換によって行われていることが報告されている（Nathans et al., 1986; Merbs & Nathans, 1992; Asenjo et al., 1994）。そこで、本研究では、錐体と桿体の光受容蛋白質の性質の違いを調べ、さらに、その違いを生み出す分子機構を検討することによって、視覚の二元説の基礎を、アミノ酸残基のレベルで解明することを試みた。

最近、分子生物学的技術の進歩により、様々な動物のロドプシンおよび錐体光受容蛋白質の一次構造が決定されている（Nathans et al., 1986; Kuwata et al., 1990; Tokunaga et al., 1990; Okano et al., 1992）。その中で、ニワトリの緑色感受性錐体光受容蛋白質であるGreenは、ロドプシンに非常に類似した一次構造を持つ（Okano et al., 1992; Wang et al., 1992）。そのロドプシンに対するアミノ酸配列の一致度は73.2%で、これまでに調べられたすべての錐体光受容蛋白質の中で最も高い。一次構造をもとに、Okanoらによって作成された分子系統樹（図1-6）によると、先祖型の光受容蛋白質はまず4種類の錐体光受容蛋白質に分岐し、その後、Greenのグループ（M2）内からロドプシンが分岐したことが推定された。すなわち、錐体光受容蛋白質とロドプシンの分岐は、Greenとロドプシンの分岐であると考えられる。また、Greenの吸収極大波長は508nmで、ロドプシンの503nmに近接している。このこ

とは、両者の吸収スペクトル制御の機構が類似していることを示唆している。すなわち、Greenとロドプシンを比較する場合、吸収スペクトル制御に伴う性質の違いを排除することができる。



光受容蛋白質	Violet	Blue	Rhodopsin	Green	Red
吸収極大波長 (nm)	415	455	503	508	571
網膜中の存在量比 (%)	1	5	49	5	40

図1-5 ニワトリの光受容蛋白質の吸収スペクトル (吉澤と岡野, 1990 より改変)

4種類の錐体光受容蛋白質はその吸収波長領域に応じて、長波長側からRed、Green、Blue、Violetと名づけられている。Redはアイオドプシンともよばれている。Greenとロドプシンは非常によく似た吸収スペクトルを持つ。

従って、Greenとロドプシンの比較をすることにより、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いを最も直接的に示すことができる。そのため、本研究では主にGreenとロドプシンの性質を比較検討した。また、Redについては、その網膜内含有量が最も高いため精製が比較的簡単であり、今までいくつかの性質が報告されている（Wald et al., 1955; Imamoto et al., 1989; Okano et al., 1992; Shichida et al., 1993; Okada et al., 1994）。そこで、ロドプシンと最も相同性の低いRedと、最も相同性の高いGreenに共通の性質を選び出すことによって、錐体光受容蛋白質に特有の性質を挙げることを目指した。

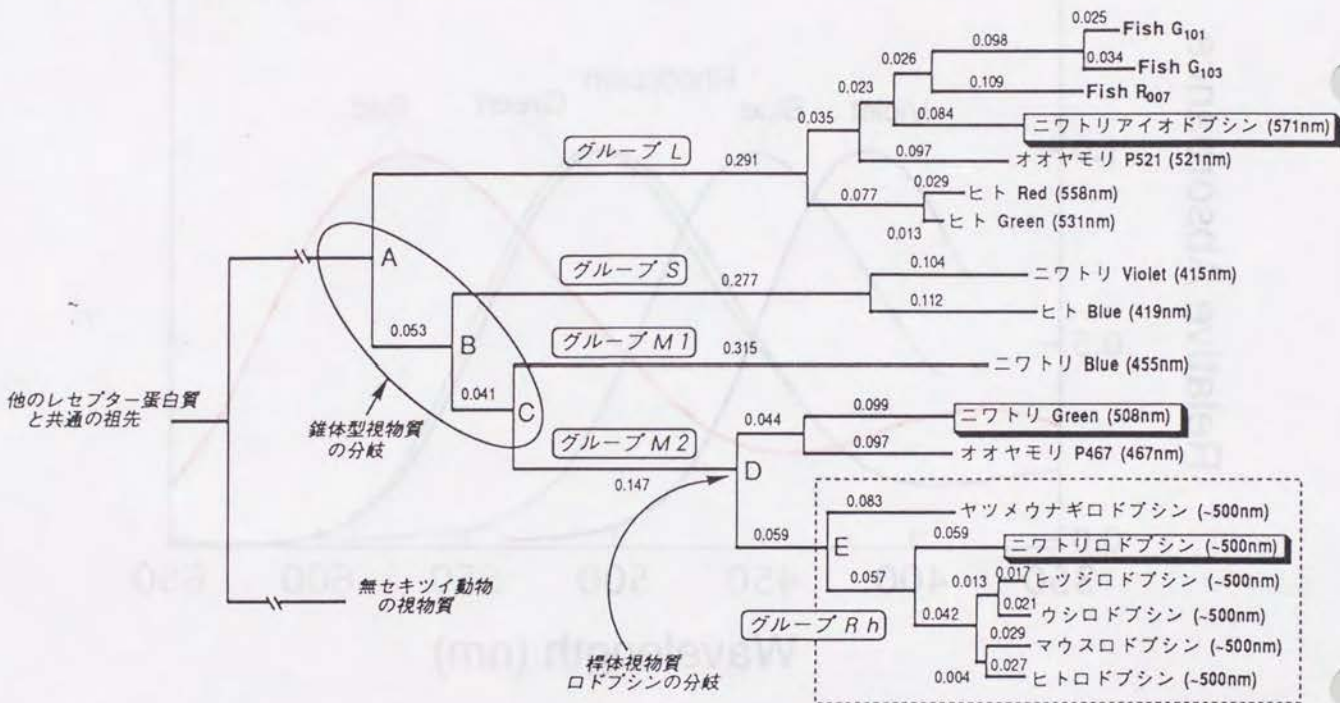


図 1-6 一次構造をもとに作製された光受容蛋白質の分子系統樹（岡野と七田, 1992c より改変）
 光受容蛋白質の一次構造をもとに近隣結合法によって作製されたもの。光受容蛋白質は一次構造の類似性からいくつかのグループに分類される。この分類は、波長感受性も同時に表している。アイオドプシンは比較的長波長側に吸収波長帯を持つグループL（Long wavelength sensitive pigments）に属する。Greenとロドプシンは共にグループM2（Middle wavelength sensitive pigments 2）に属する。様々な動物のロドプシン類はグループM2の中でさらにサブグループであるグループRhを形成する。

さらに、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いを生み出すアミノ酸残基の違いを見いだすために、Greenとロドプシンの一次構造を比較した。これは、両者の一次構造は非常に似ているため、両者で異なるアミノ酸残基の数は限られているからである（図1-7）。そして、熱力学的、蛋白化学的側面から、その役割を担うアミノ酸残基を推定した。さらに、これらの部分を改変したロドプシン変異体を作成して、その性質が錐体光受容蛋白質型になるかどうか検討した。結果的に、一つのアミノ酸残基を置換しただけで、錐体光受容蛋白質型の性質を持つロドプシンが誕生した。

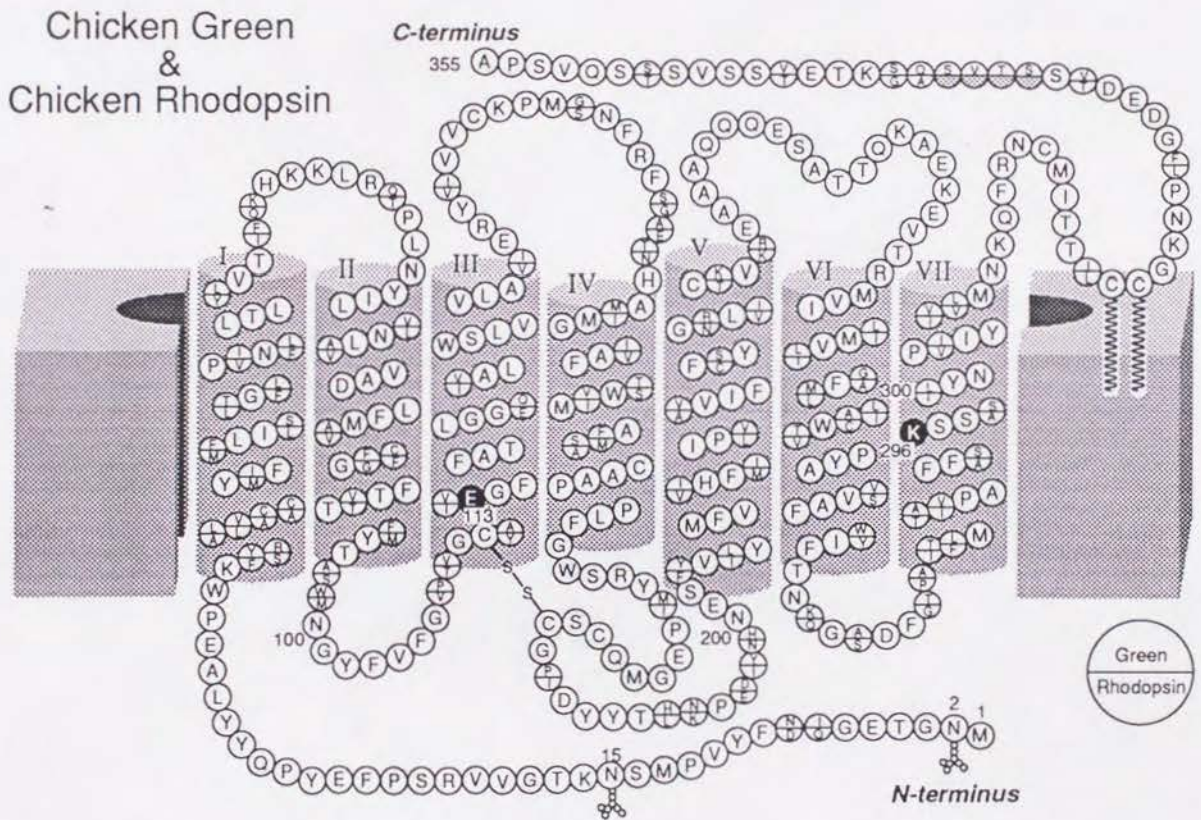


図1-7 ニワトリロドプシン及びGreenの7回膜貫通モデル

ニワトリロドプシン (Takao et al., 1988) (下段)、Green (Okano et al., 1992a) (上段) の一次構造をもとに作製した。K296、E113は多くの光受容蛋白質で保存されていることが分かっている。

第二章

試料と方法

2-1 試料の調製

2-1-1 材料と緩衝液

(a) 材料

ニワトリの頭部は、株式会社鳥ぴん（大阪）、六美養鶏加工組合（岡崎）、株式会社静岡イチレイ（浜松）のご好意により、新鮮なものを購入することができた。また、293S培養細胞株は、J. Nathans博士から、大阪大学の徳永博士を経て、供与していただいた。この系で用いた発現ベクターは、大阪大学の徳永博士の研究室で開発されたものを用いた。また、特に記載のない試薬類は、Sigma、和光純薬、ナカライテスク製のものを用いた。

(b) 緩衝液

buffer A: 50 mM HEPES, 0.6% CHAPS, 0.8 mg/mL PC, 10 mMまたは140 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 50 KIU /mL aprotinin, 4 μ g/mL leupeptin.

buffer E: 50 mM HEPES, 0.75 % CHAPS, 1 mg/mL PC, 140 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 50 KIU /mL aprotinin, 4 μ g/mL leupeptin.

buffer D-20: 50 mM HEPES, 0.6 % CHAPS, 0.8 mg/mL PC, 20 % (w/v) glycerol, 10 mMまたは140 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 50 KIU /mL aprotinin, 4 μ g/mL leupeptin.

buffer P: 50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 50 KIU /mL aprotinin, 4 μ g/mL leupeptin.

buffer PBS: 2 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl.

buffer Pm: 50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin.

培養培地: 12 g/L D-MEM/F-12 1:1, 29 mM NaHCO_3 , 15 mM HEPES, 10 % FBSまたはCS, 100 u/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin.

2-1-2 ニワトリ網膜からの光受容蛋白質の調製

(a) 概略

ニワトリの網膜に存在する4種類の錐体光受容蛋白質は、ロドプシンに比べて不安定な上に、Redを除いてその網膜中の含有量が非常に少ない。最近、その精製法が開発されてきたが（Yen and Fager, 1984; Shichida et al., 1989; Okano et al., 1989）、それでもRed以外については絶対量が少なく、精製度も低いため、蛋白化学的な研究には至らなかった。本研究では、Okanoらの方法（Okano et al., 1989; 1992b）を改良して、より多くの純度の高い光受容蛋白質を調製した。

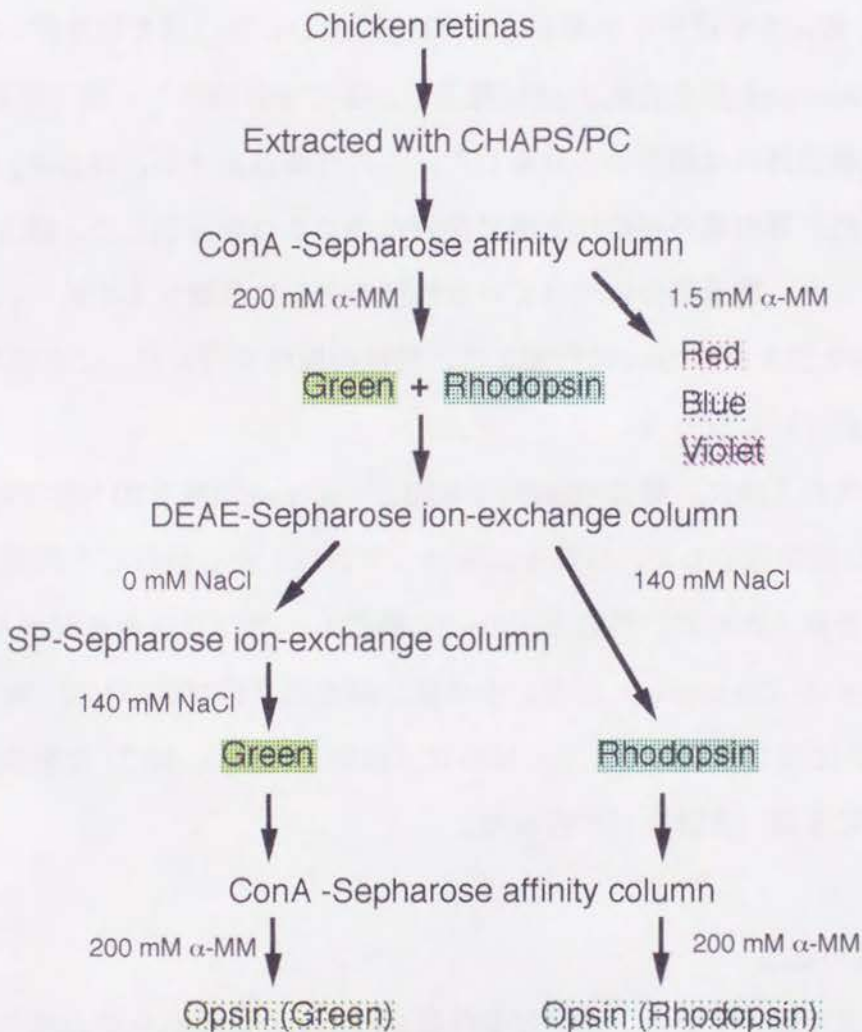


図2-1 ニワトリ網膜からの光受容蛋白質の調製の手順

(b) 視細胞外節の分離

操作は、光受容蛋白質がなるべく光退色しないように、それらの吸光度が比較的低い明赤光 ($> 630 \text{ nm}$) の下で行った。また、試料の温度は氷上で約 4°C に保った。

購入した新鮮なニワトリの頭部から、まず解剖バサミを使って眼球を摘出した。その後、眼球を赤道面に沿って半分分割し、後半球部から網膜を切り取った。得られた網膜は 4°C 、 $25,000 \text{ g}$ で10分間遠心して沈殿を -80°C の冷凍庫に保存した。

約 2,000 枚の網膜が集まったところで視細胞外節を分離した。まず、冷凍保存した網膜に buffer P を加えてすばやく解凍し、 $16,000 \text{ g}$ で遠心して上清を取り除いた。沈殿を 40 % (w/v) sucrose を加えた buffer P に懸濁し、手で 200 回激しく振とうした。この操作により視細胞外節は網膜から分離した。この懸濁液を 4°C 、 $16,000 \text{ g}$ で 40 分間遠心すると、外節等の軽い組織は上清に浮いたのでこれを回収した。残りの網膜部分は沈澱となった。網膜部分に残っている外節をさらに分離するために、沈澱を再び 40 % sucrose を加えた buffer P に懸濁して、同様の操作を行った。この操作をさらにもう一度 (計 3 回) 行った。

回収した外節を含む上清に、等量の buffer P を加えて sucrose 濃度を 20 % に下げた後、 4°C 、 $16,000 \text{ g}$ で 40 分間遠心して、外節を沈澱として回収した。回収した外節から油球などの不純物を除くために、外節を buffer P に懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズ (20 strokes) した。その後、懸濁液を再び遠心して (4°C 、 $16,000 \text{ g}$ 、40 分間) 沈澱を回収した。この操作は 4 回行い、一旦 -80°C で凍結保存、解凍してからさらに 4 回 (合計 8 回) 行った。

(c) 光受容蛋白質の抽出

十分に不純物を取り除いてから、光受容蛋白質を抽出した。これ以降の操作は、全ての光受容蛋白質が光退色しないように、暗赤色光下 ($> 660 \text{ nm}$) で行った。また、試料の温度は氷上で約 4°C に保った。まず、洗浄された外節膜断片に buffer E を

加えた。その際、今までの過程で退色した光受容蛋白質を再生させるために、網膜一枚当り 0.03 ODunit の 11-*cis*-retinal を加えた。これをテフロンホモジナイザーで十分に懸濁し、その後 1 時間静置することによって光受容蛋白質を外節膜から抽出した。抽出液は懸濁液を 4 °C、60,000 g で 1 時間遠心することにより上清として得られた。抽出液に 1/4 量の buffer P を加え、抽出液の CHAPS の濃度を 0.6 % (w/v) に、PC の濃度を 0.8 mg/mL に下げた。得られた抽出液中の光受容蛋白質の含有量は、分光学的な方法により定量した。

(d) ConA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィー

(c) の操作によって得られた光受容蛋白質の抽出液を、ConA (コンカナバリン A) を結合したアフィニティーカラムにかけ、それぞれの光受容蛋白質を分離した。ConA はレクチンの一種であり、蛋白質に結合しているある種の糖鎖と結合する。その親和性の違いを利用して各光受容蛋白質を分離した。操作は暗赤光下または完全暗黒下で行った。

まず、ConA-Sepharose のレジン (Pharmacia 製) を前処理した後、カラム (アミコン製 20 mm x 300 mm) につめ、buffer A (140 mM NaCl) によって平衡化した。流速はペリスタティックポンプ (Pharmacia 製 P-1) により 20 mL/hr に、温度は還流装置により 4 °C に保った。平衡化の後、上記の抽出液をカラムに添加して光受容蛋白質を吸着させた後、buffer A を流すことによって、油球の成分など非吸着性の不純物を取り除いた。

不純物がすべて取り除かれたことを確認した後、 α -MM (α -methyl-D-mannoside) を含む buffer A によって光受容蛋白質の溶出を行った。その際、この後の操作でイオン交換カラムを用いるため、NaCl 濃度を 10 mM にした buffer A を用いた。光受容蛋白質の含有量は、フローセルを用いた光量子計測計 (ユニソク製 SPD-M6S) により、750 nm から 250 nm の吸収スペクトルを測定することによりモニターした。また、全体の蛋白量のモニターは 280 nm の紫外光 (Pharmacia 製 UV-1) によっ

で行なった。分画は約 40 mLごとに行い、分画後すぐに、終濃度 20 % (w/v)の glycerolを加えて光受容蛋白質の安定化をはかった (Okano et al., 1989)。各分画ごとに光受容蛋白質の含有量を分光学的な方法により見積もった。

まず、1.5 mM α -MMによってViolet、Blue、Redが溶出された。これらの回収量が添加した量の90%を越えてから、3 mM α -MM、5 mM α -MMによってまだ吸着しているこれらの成分を取り除いた。これらが十分に取り除かれたことを確認した後、200 mM α -MMによってGreenとロドプシンを混合液として溶出した。その際、分画ごとに一旦カラムの流れを止めることによって、ConAと光受容蛋白質を十分に解離させ、分画中の光受容蛋白質の希薄化を防いだ。添加した量の70 %のGreen及びロドプシンを回収するまでこの溶出操作を続けた。

(e) DEAE-Sepharose陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

現在までに決定された光受容蛋白質の一次構造によると、Greenを含めた錐体光受容蛋白質のすべては、中性で正に荷電していることが示唆されている。逆に、ロドプシン類はこの条件下では電荷をもっていないか、あるいは負に荷電している

(Okano et al., 1992a)。この違いを利用して、DEAE-Sepharose陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、Greenとロドプシンを分離した。操作は暗赤光下 (> 660 nm) あるいは完全暗黒下で行った。操作中に溶出液に含まれる光受容蛋白量は、光量子計測計による吸収スペクトル、及び、280 nmの紫外光によってモニターした。

まず、前処理したDEAE-Sepharoseのレジン (Pharmacia製 Fast Flow) をカラム (アミコン製 20 mm x 300 mm) につめ、buffer D-20 (10 mM NaCl)によって平衡化した。温度は4℃、流速は100mL/hrに保った。その後Greenとロドプシンの混合液をカラムに添加した。Greenはこの条件下で正に荷電しているため、カラムに吸着せず、素通りする。そこで、素通り画分を集め、Greenの画分とした。素通り画分がすべて回収された後、buffer D-20 (10 mM NaCl)で洗浄してから、140 mM NaClを含むbuffer D-20によってロドプシンを溶出した。それぞれの画分に含まれるGreen及びロドプシ

ンの量は、分光学的な方法により決定した。

(f) SP-Sepharose陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

(d) ConA-Sepharoseカラムで得られたRed、Blue、Violetの画分、及び、(e) DEAE-Sepharoseカラムで得られたGreenの画分から、それぞれの錐体光受容蛋白質を分離精製、濃縮した。この目的のために、正に荷電している錐体光受容蛋白質が吸着する、SP-Sepharose陽イオン交換カラムを用いて分離精製及び濃縮の操作を行った。以前はCM-Sepharose陽イオン交換カラムを用いていたが (Okano et al., 1992b)、光受容蛋白質の吸着力が弱かったために、大量の試料の濃縮が完全に行われなかった。そのため、本研究では、より吸着力の強い SP-Sepharoseカラムを用いた。また、それぞれの光受容蛋白質を分離精製するために、溶出はNaClの直線濃度勾配により行った。操作は暗赤光下 ($> 660\text{nm}$) あるいは完全暗黒下で行い、温度は 4°C 、流速は 100 mL/hr に保った。操作中に溶出液に含まれる光受容蛋白量は、光量子計測計による吸収スペクトル、及び、 280 nm の紫外光によってモニターした。

まず、前処理したSP-Sepharoseのレジン (Pharmacia製 Fast Flow) をカラム (Amicon製 $20\text{ mm} \times 300\text{ mm}$) につめ、buffer D-20 (10 mM NaCl) によって平衡化した。その後、Red、Blue、Violetの画分、または、Greenの画分を添加して、それぞれの錐体光受容蛋白質をカラムに吸着させた。そしてbuffer D-20 (10 mM NaCl) により、カラムに吸着しない不純物を洗浄した後、 10 mM から 600 mM の直線濃度勾配をかけたNaClを含むbuffer D-20により溶出した。錐体光受容蛋白質はViolet、Green、Red、Blueの順番で溶出してきたので、これらを分画し、分光学的な方法により定量した。

(g) 光受容蛋白質の蛋白質部分 (オプシン) の調製

ニワトリの光受容蛋白質は共通の発色団として11-cis-retinalをもっているが、蛋白質部分として、それぞれの光受容蛋白質に固有の単一ポリペプチド (オプシン) を

持っている。光受容蛋白質を分離精製した後、ロドプシン、Red、Greenのそれぞれのオプシンを、ConA-Sepharoseカラムにより調製した。オプシンは、発色団が結合している状態に比べると著しく不安定なため、カラムへの結合は、完全暗黒下におけるバッチ法により行った。その他の操作は、蛍光灯下で行った。また、試料の温度は、低温室で4℃に保った。操作中に溶出液に含まれる蛋白量は、280 nmの紫外光によってモニターした。

まず、ConA-Sepharoseのレジン（Pharmacia製）を前処理した後、密封容器に入れ、buffer Aによって平衡化した。その後、イオン交換カラムにより調製したそれぞれの光受容蛋白質溶液を添加して、10時間完全暗黒下で攪拌した。光受容蛋白質がレジンに結合したことを確認した後、ヒドロキシルアミン存在下（10 mM）で試料を光照射（> 500 nm）して、発色団誘導体（retinal oxime）とオプシンを分離した。そして、この懸濁液をカラム（Bio Rad製 10 mm x 100 mm）につめ、10 mMのヒドロキシルアミンを含むD-20（140 mM NaCl）により、発色団誘導体を含むカラムに吸着しない成分を洗浄した。不純物が取り除かれたことを確認した後、200 mM α -MMを含むbuffer Aによってオプシンを溶出した。その際、分画ごとに一旦カラムの流れを止めることによって、ConAと光受容蛋白質を十分に解離させ、分画中の光受容蛋白質の希薄化を防いだ。それぞれの画分に含まれるオプシンの量は、11-cis-retinalを加えたのち、分光学的な方法により決定した。

2-1-3 光受容蛋白質変異体の調製

ロドプシンDNAに対する部位特異的変異の導入は、phosphorothioate法によって行った。また、光受容蛋白質変異体の調製は、下図のように、Kojimaらによって報告されている方法 (Kojima et al., 1996) に従って行った。

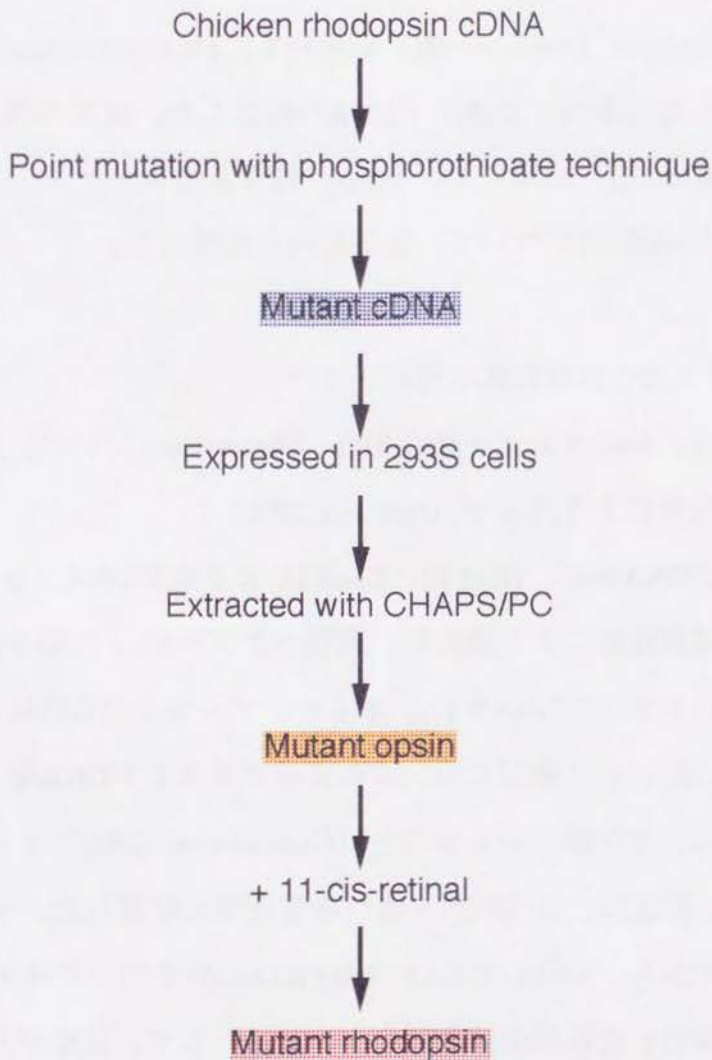


図 2-2 光受容蛋白質変異体の調製の手順

(a) 変異ロドプシンDNAの作成

部位特異的変異の導入は、phosphorothioate法によって行った。ニワトリロドプシンをコードする領域を含むDNAフラグメントZf9 (Okano et al., 1992a) をテンプレートとした。実際には、このフラグメントの5'-、3'-末端にそれぞれHind III、EcoR I部位を挿入して、プラスミドベクターpBluescript KS+ (Stratagene製) に組み込んだものを用いた。

まず、このプラスミドDNAを大腸菌株XLI-Blue (Stratagene製) にトランスフォーメーションし、ヘルパーファージVCS-M13 (Stratagene製) を用いて、一本鎖DNAを調製した。そして、Sculptor (Amasham製) を用いて、phosphorothioate法によって、部位特異的変異を導入した二本鎖プラスミドDNAを作成した。変異の導入の確認は、Sequenase Ver.2.0 (Amasham製) を用いて、dideoxy 法によるシーケンシングにより行った。また、同様にZf9全配列について、塩基配列を確認した。

(b) 培養細胞系における光受容蛋白質の発現

光受容蛋白質の発現は、発現ベクターpUC-SR α (Kayada et al., 1995) を用いて、ヒト腎臓由来の293S細胞系により行った (Nathans, 1990)。

まず、変異プラスミドDNAから、Hind III、EcoR Iにより変異DNAフラグメントを切り出してアガロース電気泳動により精製し、発現ベクターSR α に組み込んだ。サブクローニングの後、ロドプシンDNAを含むSR α を、アルカリSDS法により大量調製し、CsCl密度勾配遠心法により精製した。この変異プラスミドDNAを、スプリット後1晩経た293S細胞に、リン酸カルシウム法 (Gorman et al., 1990) を用いてトランスフェクションした。細胞は、10 %FBSを含む培養液中で培養した。トランスフェクション後3日間経ってから、5 mM EDTAを含むPBS bufferを用いて細胞を回収した。その後、回収した細胞を含む懸濁液を遠心 (7,000 g) して、沈殿から光受容蛋白質試料を調製した。

(c) 発現した光受容蛋白質試料の調製

発現した光受容蛋白質試料の調製は、Nathansによって報告されている方法 (Nathans, 1990b) を、一部変更して用いた (Kojima et al., 1996)。試料の温度は氷上で約4℃に保ち、操作は蛍光灯下で行った。まず、回収した細胞を含む沈殿を8.6% sucroseを含むbuffer Pmに懸濁し、ミキサー (IKA-WERK製) で細胞を破碎した。この試料を、40% sucroseを含むbuffer Pmに重層し、密度勾配遠心 (80,000 g) した界面部分を、膜画分として回収した。この画分に三倍量のbuffer Pmを加えて遠心 (50,000 g) することにより、膜画分の沈殿を得た。この沈殿に、buffer Eを加えてホモジナイズ (50 strokes) した後、30分間静置して光受容蛋白質 (オプシン) を可溶化した。光受容蛋白質 (オプシン) は、この溶液を遠心 (90,000 g) した上清に含まれていた。3-6-4の、再生速度の測定には、この試料を用いた。また、3-6-2、3の吸収スペクトルの測定、及び、メタII中間体の崩壊速度の測定には、この試料に11-cis-retinal (500 μ M) のエタノール溶液 (5 μ L) を添加して光受容蛋白質を再生させた試料を用いた。

2-2 測定方法

2-2-1 光受容蛋白質の分光学的定量と吸収極大波長の決定

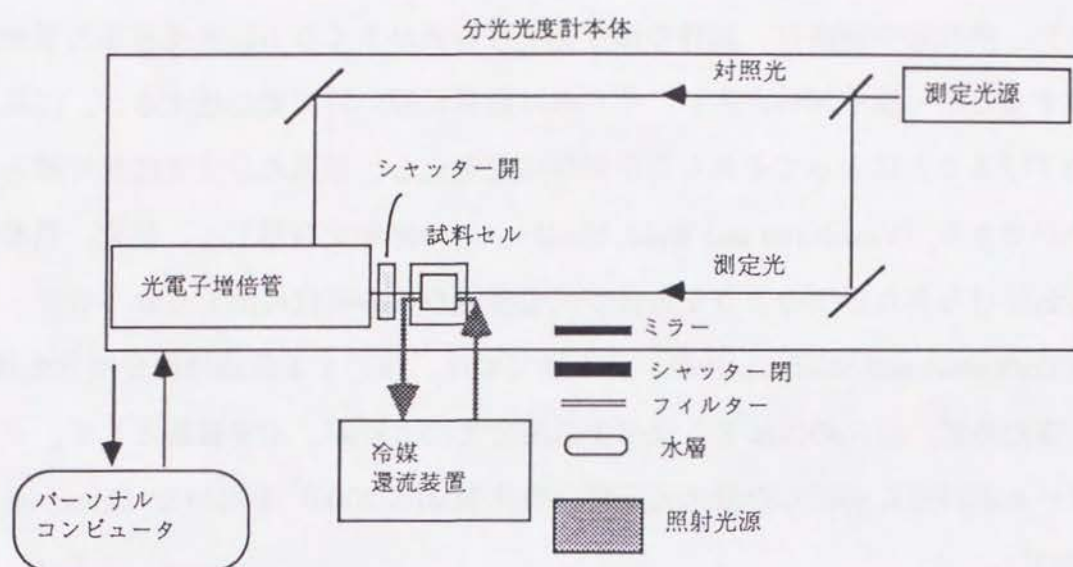
光受容蛋白質の定量、および、吸収極大波長の決定は、分光学的な方法により行った (Okano et al., 1989)。測定はすべて、パーソナルコンピュータ (NEC製 PC9801) を接続した分光光度計 (島津製 MPS-2000) を用いて行った。また、試料セルホルダーは、冷却環流装置 (Nesrab製 RTE-220) を接続して4℃に冷却した。試料の光照射は1kWのプロジェクターランプ (Master製 Hi-Lux HR) により行った。このとき照射光に含まれる熱線を吸収するために、試料とプロジェクターランプの間に5 cmの水層を設置した。照射光の波長調節には、色ガラスカットオフフィルター (東芝製 R-68、R-61、O-54、Y-52、Y-50) を用いた。照射光は分光光度計の試料室外から入射し、反射鏡で反射されて、測定光と同軸で試料に入射するようになっている。

ニワトリ網膜から精製したRed、ロドプシン+Green、Blue、Violetの定量は、それぞれの吸収スペクトルの違いを利用して、様々な波長の光照射を行う部分退色法によった。すなわち、試料をヒドロキシルアミン (10 mM) 存在下で順に暗赤色 (> 660 nm)、明赤色 (> 590 nm)、橙色 (> 520 nm)、黄色 (> 480 nm) の光で照射し、それぞれの光で退色する成分を順番に、それぞれの光受容蛋白質とした。また、ロドプシンとGreenは吸収スペクトルが似ているので、ヒドロキシルアミンに対する耐性を指標に定量した。すなわち、50 mMヒドロキシルアミン存在下で、暗中で退色する成分をGreen、退色しない成分をロドプシンとした。

培養細胞により発現した光受容蛋白質の分光学的定量と吸収極大波長の決定は、ヒドロキシルアミン存在下での、光照射前後の差スペクトルにより行った。まず、調製後の試料に11-cis-retinalを添加して光受容蛋白質を再生させた。その後、ヒドロキシルアミン (10 mM) を加えて遊離の11-cis-retinalをretinal oximeに変化させた後、試料を光照射 (> 500 nm) した。光照射前の吸収スペクトルから光照射後の吸収スペクトルを引いた差スペクトルを計算して、500 nm付近の正のピークを、発現した

光受容蛋白質の吸収極大波長とした。

a. 測定中



b. 照射中

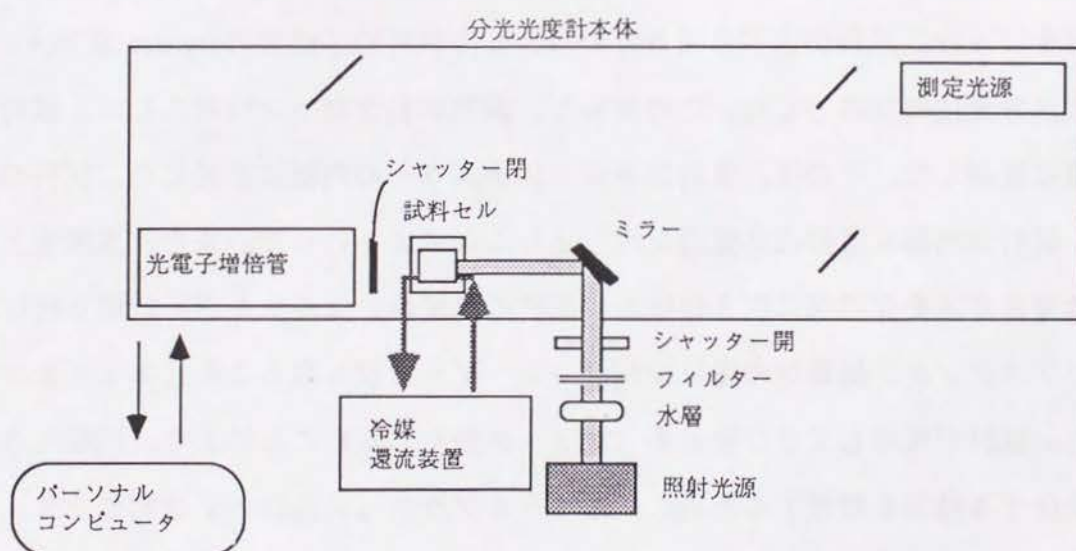


図 2-3 汎用的分光測定装置

2-2-2 従来型低温分光法

光受容蛋白質の構造変化過程をモニターするために、低温分光法を用いた（図2-3）。熱反応の速度は、試料の温度を下げると小さくなる。光受容蛋白質が光を吸収すると様々な中間体が生じ、それらは非常に短い時間で崩壊するが、試料の温度を下げることによってそれらの中間体は安定化し、普通の分光光度計で捕らえることができる（Yoshizawa and Wald, 1963）。この原理を利用して、従来、低温分光法と名付けられた以下のような方法が光受容蛋白質の研究に用いられてきた

（Yoshizawa and Shichida, 1982）。本論文では、後述する低温時間分解分光法と区別するために、従来の方法を、従来型低温分光法と呼ぶ。測定装置として、ガラスデュワーを試料室に接続した分光光度計（島津製MPS-2000）を用いた（Imamoto et al., 1989）。

光路長が約2 mmのため、試料は限外濾過膜（AMICON製YM-30）により濃縮した。その後、試料のbuffer組成をそろえるため、30倍～100倍量のbuffer D-20に対して6回透析を行った。試料が透明に凍るために、この試料に2倍量のglycerolを加え、従来型低温分光法の試料とした。この試料を、銅製試料ブロックに封入して、試料筒の先端に接続した。その後、試料筒をガラスデュワーの内部に密封した。試料の冷却は、試料筒内部に直接液体窒素を流し込むことにより行った。また、温度を上げる時は窒素ガスを充填部に吹き付けた。試料の温度は、セルホルダーに取り付けた銅-コンスタンタン熱電対の電位変化をレコーダーで読み取ることによってモニターした。試料が凍結してひび割れる（クラックが生じる）ことにより、測定光の散乱が変化する効果を軽減するために、オパールガラス（乳白色の半透明ガラス）を試料光と測定光の光路にいれ、あらかじめ測定光を十分散乱させておいて、クラックによる散乱の寄与を少なくした。また、クラックによる測定光の散乱が変化する効果を軽減する目的、及び、光受容蛋白質の吸収スペクトルが温度により変化することを防ぐ目的で、吸収スペクトルの測定は、一定の温度で行った。試料の光照射は、

2-3-1で記述した方法と同様にして行った。

従来型低温分光法は、試料を冷却することにより中間体を安定化する方法であるが、別の言葉を用いると、中間体の崩壊を目に見えないほど遅くする方法である。従って、温度を上昇させてゆくと、ある温度で中間体の崩壊を観測できるようになる。この温度を遷移温度（速度論的臨界温度）または、中間体の安定温度と呼び、反応速度の指標として用いる。遷移温度を反応速度の指標として用いる方法は、連続した中間体の生成、崩壊反応の時定数が、比較的よく分離できるときに有効な手段である。

2-2-3 時間分解低温分光法

従来型低温分光法では、中間体の吸収スペクトルを測定するために、その熱反応を目に見えないほどに遅くした。ところが、遷移温度を反応速度の指標として用いているため、同様の状態の試料間の反応速度の比較は出来るが、他の温度の反応、例えば室温で起こる実際の物質の反応速度などと比較することには困難を伴う。以下に述べる時間分解低温分光法はこの欠点を補うために、試料の熱反応が秒から十時間程の領域で起こるような温度条件を選び、ゆっくり起こる反応を分光光度計で測定する方法である（Imai et al., 1994）。

測定はすべて、パーソナルコンピュータ（NEC製PC9801）を接続した分光光度計（島津製 MPS-2000）を用いて行った。30℃から-10℃の温度領域の測定には、冷却環流装置（Nesrab製 RTE-220）を接続した試料セルホルダーを用いた。また、-10℃以下の低温領域の測定には、温度コントローラー（Oxford製 ITC-4）を接続したクライオスタット（Oxford製 CF-1204）を用いた。この時試料は、ガラス筒の先に石英セルを溶接した試料セル（10 mm x 10 mm）に封入し、クライオスタット内に設置した。また、この時試料の凍結を防ぐために、試料に等量のglycerolを加えた。試料の光照射は、2-3-1で記述した方法と同様にして行った。光退色過程の測定後に、ヒドロキシルアミンを加えて中間体を崩壊させた。その後、試料を黄色光

(> 500 nm) で光照射することにより、残存の光受容蛋白質を光退色させた。この量を、実験前の試料の量から差し引くことにより、光反応した光受容蛋白質の量を見積もった。

この方法では、従来型低温分光法に比べて、濃度の低い少量の試料で、中間体の生成、崩壊に伴う多くの分光学的情報を得ることができた。そのため、入手が比較的困難な試料の分光学的研究 (Kojima et al., 1995) や、ごく精密な測定が求められる研究 (Imai et al., 1994) に適用されている。また、試料セルを工夫したことにより、ヒドロキシルアミンなどの薬剤を、実験中に添加することが可能になった。

2-2-4 再生速度の測定方法

錐体光受容蛋白質の再生は、ロドプシンに比べて著しく速かった。このため、再生速度の測定は、分光光度計の測定波長を一つの波長に固定したタイムスキャンモード (1秒～30分の時間領域) と、一定時間ごとに吸収スペクトルを測定するリピートスキャンモード (10分～10時間の時間領域) を併用して行った。11-cis-retinalは、all-trans-retinal (Sigma製) を蛍光灯下で光異性化し、HPLC (Yamamura製 YMC-012-3) により精製した (Maeda et al., 1978a)。

ニワトリ網膜から調製した光受容蛋白質の再生速度は、パーソナルコンピュータ (NEC製 PC9801) を接続した分光光度計 (島津製 UV-3000) を用いて行った。試料セルホルダーは、冷却環流装置 (東京理化学製 CA-111L) を接続して4℃に冷却した。まず、オプシン溶液 (250 μL) に11-cis-retinal (7.5 μM) のエタノール溶液 (5 μL) を添加した。その後すぐにタイムスキャンモードの測定を開始し、ロドプシンとGreenは530 nmの、Redは吸収極大波長である570 nmの吸光度の変化を測定した。これは、440 nmに吸収極大波長を持ち、530 nm以上にほとんど吸収のないランダムシッフベースの生成反応を検出しないためである。30分後、リピートスキャンモードの測定に切り替え、吸収スペクトルの時間変化を測定した。試料の濃度は、あらかじめヒドロキシルアミン存在下で光照射することにより測定しておいた。この値

を用いて、再生時の吸光度の変化量を規格化した。この反応は等量の二分子が結合する反応なので、吸光度の変化曲線を双曲線によって近似し、再生の速度定数を算出した。

また、培養細胞により発現した光受容蛋白質の再生速度は、パーソナルコンピュータ（NEC製 PC9801）を接続した分光光度計（島津製 MPS-2000）を用いて行った。試料セルホルダーは、冷却環流装置（Nesrab製 RTE-220）を接続して4℃に冷却した。まず、オプシン溶液（200 μ L）に11-cis-retinal（500 μ M）のエタノール溶液（5 μ L）を添加した。その後、タイムスキャンモード、10分後にリピートスキャンモードに切り替えて、530 nmの吸光度の時間変化を測定した。再生反応が終了した後、再生した光受容蛋白質の定量を行った。この値を用いて、再生時の吸光度の変化量を規格化した。その後、吸光度の変化曲線を指数関数曲線によって近似し、再生の速度定数を算出した。

第三章

錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質

本章では、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いを検討するために、主に Green とロドプシンの性質を比較検討した。まず、Green の性質を、ロドプシンに似ているものと、ロドプシンとは異なり Red に似ているものとに分類した。その後、後者を錐体光受容蛋白質に特有の性質として、どの段階でこのような性質が表れるのか検討した。なお、本章の内容は、主論文 1 (Shichida et al., 1994)、主論文 2 (Imai et al., 1995) として添付した。

3-1 光受容蛋白質の再生速度

視細胞内節で合成された光受容蛋白質のアポ蛋白質オプシンは、発色団である 11 シスレチナールと結合して、はじめて光受容蛋白質としての機能を持つようになる。また、光反応によって退色したオプシンも、11-cis-retinal と結合して再生する。現在までの知見によると、再生反応の速さは視細胞の暗順応（光化学的暗順応）の過程に反映されていることがわかっている (Dowling and Wald, 1958; Rushton, 1961)。また、Red の再生速度はロドプシンの約 500 倍である事が報告されている (Wald et al., 1955) ため、錐体光受容蛋白質の再生速度は一般に速いのかどうかに興味深いところである。特に、Green の一次構造はロドプシンに非常に近いため、その再生速度がロドプシンに近いことも十分考えられる。そこで、Green の再生速度がロドプシンと同程度なのか、それとも Red に近いのか、比較検討した。

それぞれのオプシン溶液に 11-cis-retinal を添加して、光受容蛋白質の再生に伴う吸光度の時間変化を測定した。再生反応は錐体光受容蛋白質である Red、Green が非常に速く、ロドプシンはこれらに比べると遅い再生反応を示した。吸光度の時間変化を双曲線で近似して、反応の速度定数を求めたところ、Red、Green、ロドプシンの再生速度定数は、それぞれ 1 分、2.5 分、4 時間であった。すなわち、Green はロドプシンよりも約 100 倍速く再生して、その速度は、むしろ Red のものに近かった。この結果は、錐体光受容蛋白質の再生速度は一般に速いことを示唆していると考えられる。一次構造が近いのにもかかわらず、Green とロドプシンの再生速度が大きく異なることは、非常に興味深い現象である。

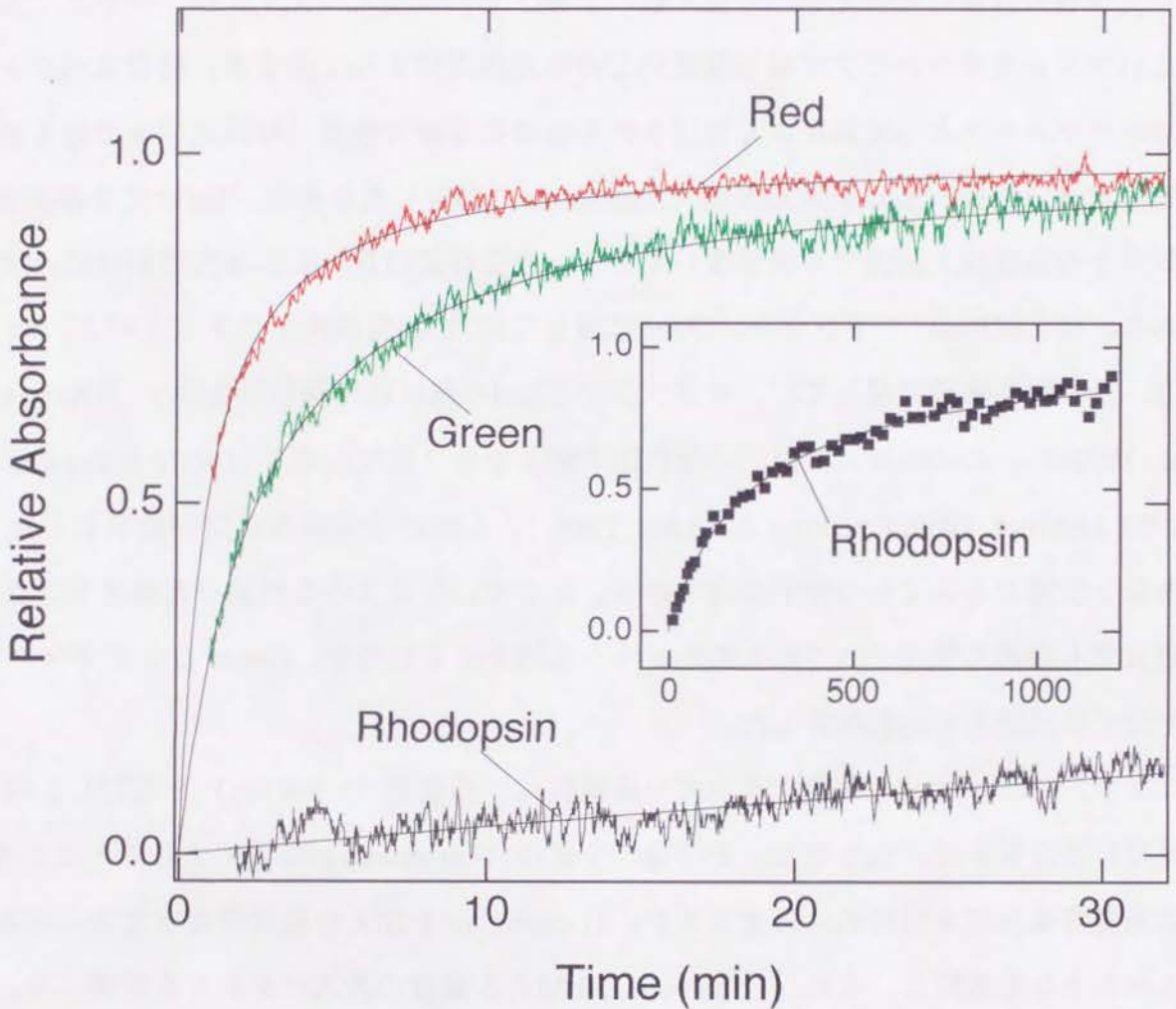


図3-1 Red、Green、ロドプシンの再生過程

それぞれの光受容蛋白質のオプシン溶液 (150 nM、pH 6.6) 250 μ Lに、5 μ Lの11-cis-retinalのエタノール溶液 (7.5 μ M) を0 $^{\circ}$ Cで加えて、すばやく攪拌した。その後、試料の温度を0 $^{\circ}$ Cに保ったまま、光受容蛋白質を完全に再生させた。Green、ロドプシンの再生に伴う530 nm、または、Redの再生に伴う570 nmの吸光度の時間変化を示す。黒色の曲線は、それぞれの吸光度の変化を近似した双曲線である。Red、Green、ロドプシンに対する曲線は、それぞれ1分、2.5分、4時間の時定数を持つ。(内挿図) ロドプシンの再生過程を、時間領域を拡大して示した。

3-2 光受容蛋白質の光化学的性質

3-2-1 光受容蛋白質の分子吸光係数（発色団周辺の静的構造）

光受容蛋白質は可視光領域の光を吸収する。その吸収スペクトルは、発色団である11シスレチナールとアポ蛋白質部分との相互作用によって決まる。吸収スペクトルのパラメータとして現在よく使用されるのは吸収極大波長（可視光領域で最も吸光度が高い波長）と分子吸光係数（光路長1cmで測定したときの、1Mの光受容蛋白質分子の吸収極大波長での吸光度）である。光受容蛋白質の吸収極大波長は様々であり、例えばRedはロドプシン、Greenに対して約70 nm長波長シフトしている。一方、分子吸光係数に関しては、ロドプシンとRedの値はほぼ同じ値を示す（Okano et al., 1992b）。この値は、溶液中の発色団の値よりも2倍程度高く（Wald & Brown, 1953; Hubberd, 1956; Freedman & Becker, 1986）、これが光受容蛋白質が効率よく光情報を伝達できることの分子基礎である。そこで、このような性質が錐体光受容蛋白質でも共通に保持されているのかどうかを確かめるために、Greenとロドプシンの分子吸光係数を比較検討した。

まず、GreenとRedが等量含まれている試料に、赤色光（> 590 nm）を照射し、両光受容蛋白質を光退色させた。その後、少量の11-cis-retinalを順次加えることにより、両光受容蛋白質を部分的に再生させた。11-cis-retinalを加えた後10分たってから吸収スペクトルを測定し、また、11-cis-retinalを加える前後の差スペクトルを計算した。再生した光受容蛋白質にはGreenとRedが含まれているので、その量を、両光受容蛋白質の吸収スペクトルをもとに算出した。それぞれの部分再生反応時に加えた11-cis-retinalの量は一定なので、以下のような等式が成り立つ。

$$\frac{\text{Abs}_{\text{green}}}{\epsilon_{\text{green}}} + \frac{\text{Abs}_{\text{iod}}}{\epsilon_{\text{iod}}} = [\text{11-cis-retinal}] = \text{Const.}$$

$$\text{Abs}_{\text{green}} = - \frac{\epsilon_{\text{green}}}{\epsilon_{\text{iod}}} \text{Abs}_{\text{iod}} + \text{Const.}$$

すなわち、それぞれの部分再生反応時の Abs_{green} を Abs_{red} に対してプロットすることにより、近似曲線の傾きからGreenの分子吸光係数が求められるはずである。実際に計算された3'から6'の4点は直線上にプロットされた。その後の3点は、直線から外れてきた。このことは、5点目からは、加えたレチナールの量が過剰であったことを示している。そこで、最初の4点の近似直線の傾き-0.86から、Redの分子吸光係数47,200を用いて、Greenの分子吸光係数を計算したところ、40,600という値が得られた。この値は、ロドプシンと極めて近い。

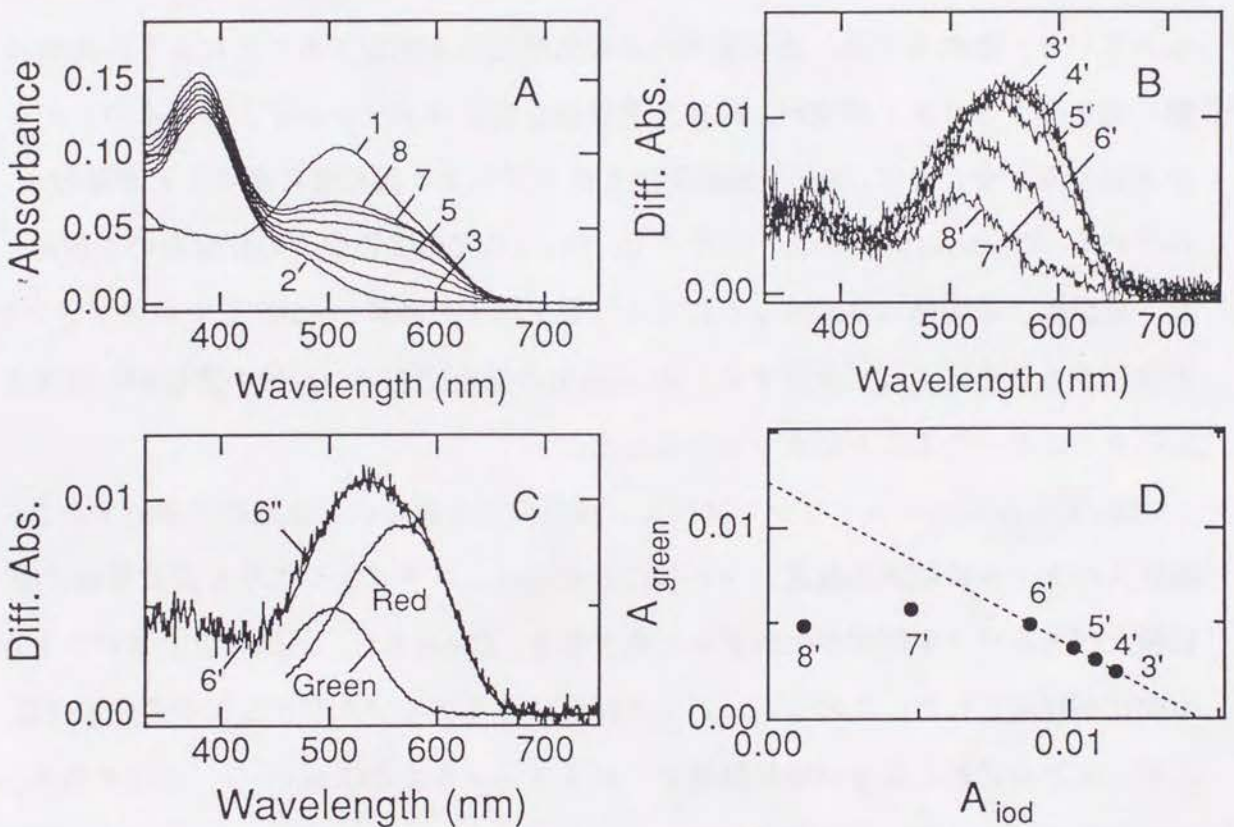


図3-2 光受容蛋白質の分子吸光係数の算出

(A) GreenとRedの混合液 (Curve 1) を赤色光 (> 590 nm) で40分間照射して、両者のオプシン溶液 (curve 2) を作成した。その後、150 μ Mの11-cis-retinalを含むエタノール溶液 (1 μ M) を0℃で加えて、すばやく攪拌した。その後、試料の温度を0℃に保ったまま、光受容蛋白質を完全に再生させ、40分後に吸収スペクトルを測定した (curves 3-8)。(B) 11-cis-retinalを添加する前後の差吸収スペクトル。(C) GreenとRedの吸収スペクトルを用いて、Bの11-cis-retinalを添加する前後の差吸収スペクトル (curve 6') を再構成した (curve 6'')。(D) 11-cis-retinalを添加したときの、再生したGreenとRedの量比。Greenの量をRedの量に対してプロットした。

3-2-2 光受容蛋白質の光感受性（発色団周辺の動的構造）

光受容蛋白質が光を吸収すると、そのエネルギーを用いて11-cis型の発色団がall-trans型に異性化する。この反応の量子収率は、メタノールなどの溶液中の11-cis-retinalシッフ塩基に比べて著しく高い（Dartnall, 1967; Kropf & Hubbard, 1970; Freedman & Becker, 1986; Koyama et al., 1991）。この高い異性化効率、我々の視覚系が非常に効率よく周囲の光情報を捕らえる分子基礎の一つである。すなわち、光受容蛋白質は発色団の環境を整えることによって、高い光感受性を得ていると考えられている。この項では、光受容蛋白質の光感受性を測定することにより、実際に動く発色団をとりまく環境が、錐体光受容蛋白質とロドプシンで、異なるのかどうか検討する。今までに、Redの光感受性もロドプシンと同程度に高いことが報告されている（Okano et al., 1992b）。そこで、Greenの光感受性がどの程度なのか検討した。実験は、中間体の安定性などによる影響を防ぐために、 -185°C でロドプシンを光照射することによって生成する、all-trans型の発色団を持つバソ中間体が生成する反応をモニターすることによりおこなった。

-185°C に冷却したロドプシン試料に、緑色の光を短時間、連続的に照射すると、吸収スペクトルは順次長波長シフトした。これは、ロドプシンよりも長波長側に吸収極大があるバソ中間体が生成するためである。Greenでも、同様の吸収スペクトルの変化が観測された。このうち、二光子反応によりアイソロドプシンが生成する反応が、ほとんど起こらない時間領域で、ロドプシンまたはGreenから、バソ中間体への光反応過程を、550 nmの吸光度変化によりモニターした。図3-3は550 nmの吸光度変化を照射時間に対してプロットしたものである。この変化過程は、ロドプシンとGreenではほぼ同じ時定数を持つことがわかる。すなわち、ロドプシンとGreenの光感受性は、ほぼ同様であることがわかった。ロドプシンとGreenの発色団を取り巻く環境は、発色団の動きの中でも同様であると言えよう。前節で、ロドプシンとGreenの分子吸光係数は、ほぼ同じであることがわかったので、両者の量子収率は、ほぼ同じであるといえる。ちなみに、Redの量子収率も、ロドプシンとほぼ同様で

あることが示されている (Okano et al., 1992b)。

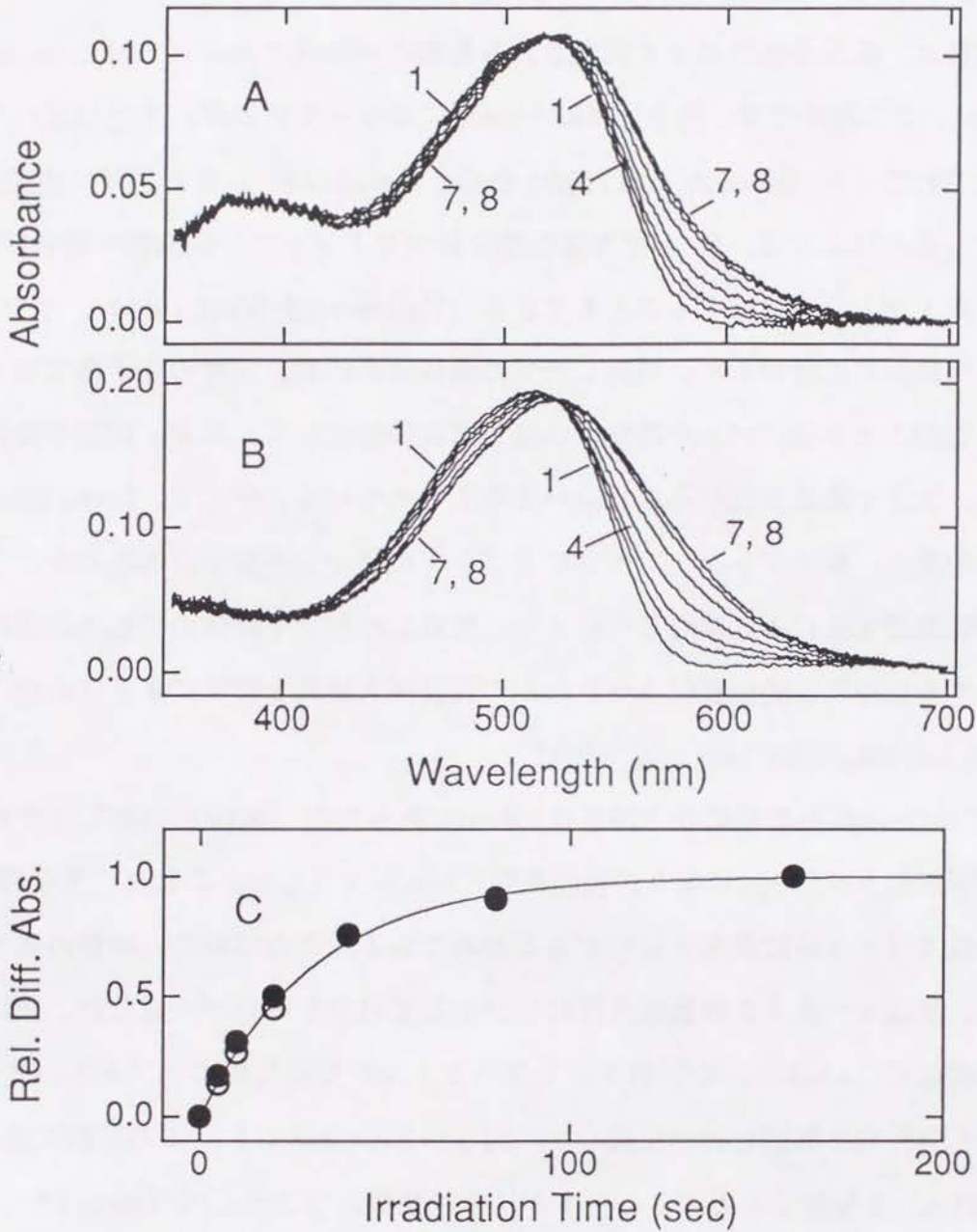


図 3-3 光受容蛋白質の光感受性

(A、B) バソ中間体の生成に伴う吸収スペクトルの変化。 -185°C まで冷却したGreen試料 (A) またはロドプシン試料 (B) (curves 1) を青色の光 (436nm) で合計5秒、10秒、20秒、40秒、80秒、160秒間照射してそれぞれ吸収スペクトルを測定した (curves 2-8)。(C) Green (○) または、ロドプシン (●) のバソ中間体の生成に伴う 530nm の吸光度の変化を、照射時間に対してプロットした。曲線は、両者を近似した指数曲線を表す。

3-3 光受容蛋白質の光退色過程

3-3-1 バソ中間体（発色団の異性化反応）

バソ中間体は、低温分光法により同定される最初の間mediateである（Yoshizawa & Wald, 1963）。この段階では、発色団はall-trans型にはなっているが、まだねじれていると報告されている（Horiuchi et al., 1980; Eyring et al., 1982）。また、バソ中間体を光照射することによって、11-cis型の発色団を持つロドプシン、9-cis型の発色団を持つアイソロドプシンを生成することもできる（Yoshizawa & Wald, 1963）。すなわち、三者の間に光可逆性があり、照射した光の波長依存的に、三者の光平衡状態が存在する。このことから、バソ中間体では発色団は異性化しているが、周囲の蛋白質部分には、大きな構造変化が見られないと考えられている。そこで、Greenでも同様に、バソ中間体、ロドプシン、アイソロドプシンの間の光可逆性があるのかどうかを従来型低温分光法により検討した。また、生成したバソ中間体の発色団周辺の構造を検討するために、絶対吸収スペクトルの吸収極大波長を計算により求めた（Yoshizawa & Shichida, 1982; Imai et al., 1994）。

0℃におけるGreen試料の吸収極大波長は508nmであったが、試料を-185℃まで冷却すると、吸収極大は516nmになり、長波長側に8nmシフトした。これは、光受容蛋白質の吸収スペクトルに温度依存性があるためである。この試料に、緑色の光を照射すると、吸収スペクトルは長波長側にシフトしてバソ中間体が生成した。次にこの試料に橙色光（>540nm）を照射するとスペクトルが短波長側にシフトし、アイソ色素を多く含む光平衡混合物が生成した（図5-2c, curve 11）。この試料に再び緑色光（501nm）を照射すると、スペクトルは長波長側にシフトして（curve 12）、先のバソ中間体を多く含む光平衡混合物（緑色光による）のスペクトル（curve 10）と一致した。つまり、Greenでもロドプシンと同様に、-185℃ではGreen、バソ中間体、アイソ色素をそれぞれ多く含む光平衡状態が存在し、これらの間には互いに光可逆性があることがわかった。ロドプシン試料に対して同じ操作を行なった時も、同様の結果、すなわち光平衡混合物の生成が観測できた。生成したバソ中間体の吸収極大波長は、Greenとロドプシンともに549 nmであった。これらの結果は、バソ中

間体の状態でも、Greenとロドプシンの発色団周辺の総体的な構造はよく似ていることを示唆している。

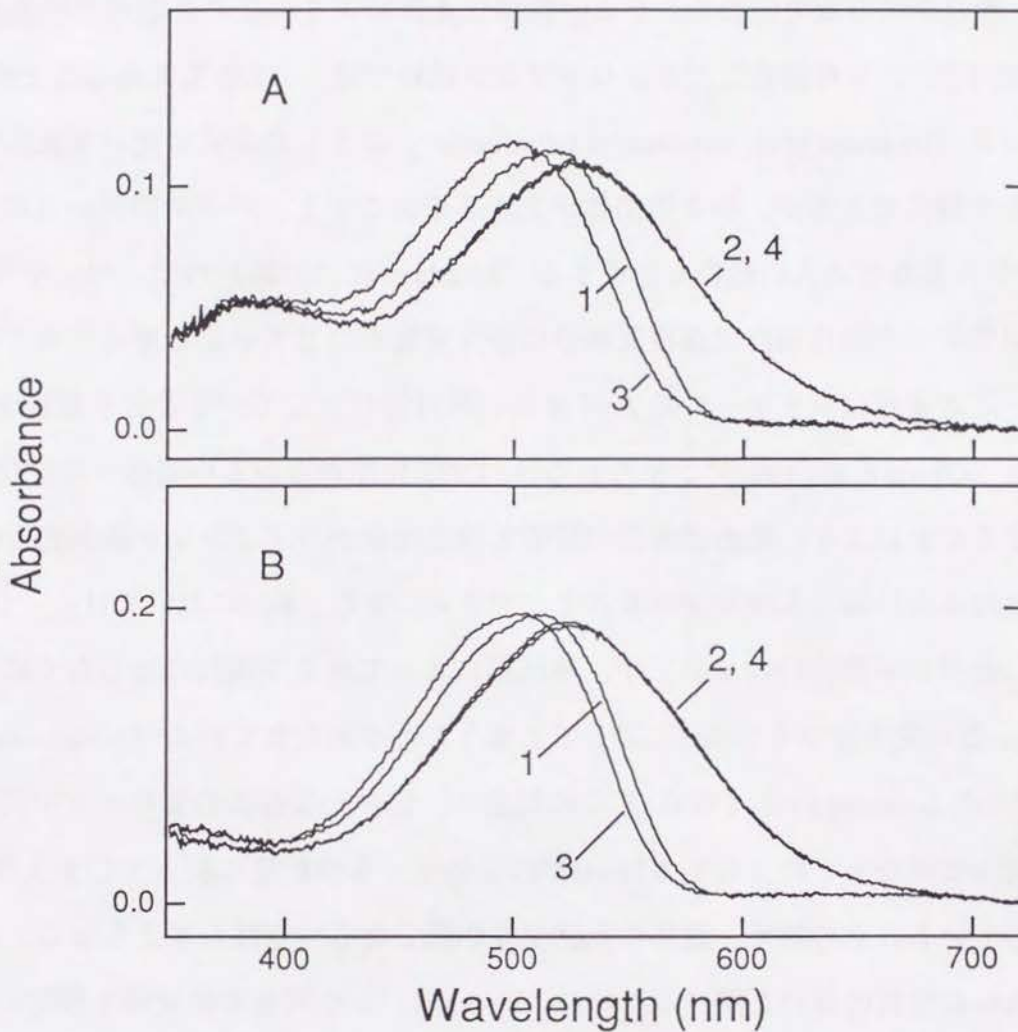


図3-4 光反応によるバソ中間体の生成過程

-185℃まで冷却したGreen試料(A)またはロドプシン試料(B)(curves 1)を、それぞれ緑色光(501 nm)で合計120秒間照射して、吸収スペクトルを測定した(curves 2)。その結果、バソ中間体をさらに多く含む光平衡混合物(緑色光による)が生成した。バソ中間体を多く含む光平衡混合物(緑色光による)を橙色の光(>540 nm)で合計480秒間照射するとスペクトルが短波長側にシフトし、アイソ色素を多く含む光平衡混合物が生成した(curves 3)。この状態の試料に再び緑色光(501 nm)を照射すると、スペクトルは長波長側にシフトして(curves 4)、先のバソ中間体を多く含む光平衡混合物(緑色光による)のスペクトル(curves 2)と同じスペクトルが得られた。

3-3-2 バソ中間体からルミ中間体へ

(発色団周辺の局所的構造変化)

バソ中間体は、熱反応によりルミ中間体へと変化する。この反応は、室温ではナノ (10^{-9}) 秒の時間領域で起こる。また、低温分光法により、この反応の遷移温度は、CHAPS-PCにより可溶化したウシロドプシン試料では、 -120°C であることが示されている (Imamoto et al., manuscript submitted)。こうした非常に速い熱反応で生じるルミ中間体であるが、ルミ中間体が光反応をおこすと、バソ中間体からは生成しない7シス体などの人口産物も生成する (Maeda et al., 1978b) ので、バソ中間体からルミ中間体への変化過程で蛋白質部分に多少変化が生じていると考えられている。また、この変化はレチナールの β -イオノン環付近に生じていると言う報告がなされている (Okada et al., 1991)。すなわち、バソ中間体からルミ中間体への変化過程を検討することにより、発色団周辺の局所的構造変化がロドプシンと錐体光受容蛋白質でどのように異なるのか調べることができる。また、Redにおいては、 -185°C で生成したバソ中間体の90%以上が、熱反応によってルミ中間体にはならず、もとの11-cis型の発色団をもつRedに戻ってしまうことが知られている (Yoshizawa and Wald, 1967; Imamoto et al., 1989)。この現象は、錐体光受容蛋白質のバソ中間体がルミ中間体にはならず、もとの11-cis型の発色団をもつ状態に戻ってしまう可能性を示唆している。その結果、錐体の光感受性が低くなる可能性も考えられる。そこで、これらの性質の違いを調べるために、Greenのバソ中間体の熱反応を検討した。

-185°C でバソ中間体を多く含む光平衡状態を生成した後、Greenのバソ中間体の熱反応過程を測定した。吸収スペクトルに対する温度の効果を防ぐために、3-3-1で得られたバソ中間体を多く含む光平衡混合物の温度を、 -180°C から -90°C まで 10°C ずつ上げ、その都度 -185°C まで冷却してスペクトルを測定した。 -185°C から -150°C までは、スペクトルの変化は認められなかった。 -140°C まで温度を上昇させると、スペクトルが短波長シフトした。さらに温度を上昇させると、吸収スペクトルはさらに短波長シフトした。この後、試料の温度を $+20^{\circ}\text{C}$ まで上昇させると、Greenのバソ中間体は崩壊して、最終的にレチナールとアポ蛋白質部分に解離したの

で、この反応はバソ中間体からルミ中間体への遷移反応であると考えられた。ニワトリロドプシン試料に対して同じ実験を行なった結果、Greenと同様にバソ中間体からルミ中間体への遷移過程が観測された。しかし、その遷移温度はGreenの場合よりも高く、 -120°C であった。この結果から、Greenのバソ中間体からルミ中間体への変化が、ロドプシンよりも起こりやすいことが示された。すなわち、バソ中間体からルミ中間体への変化にかかわるような局所的蛋白質構造に、ロドプシンとGreenの間に違いがあることがわかる。また、アイオドプシンのようなバソ中間体が元の光受容蛋白質に戻る反応は、Greenの場合には観測できなかった。従って、「すべての錐体光受容蛋白質のバソ中間体は、ルミ中間体にはならずもとの11-cis型の発色団をもつ状態に戻ってしまう」可能性は否定された。生成したルミ中間体の吸収極大波長は、Greenが511 nm、ロドプシンが509 nmであった。このことは、ルミ中間体に至っても、Greenとロドプシンの発色団周辺の総体的な構造はよく似ていることを示している。

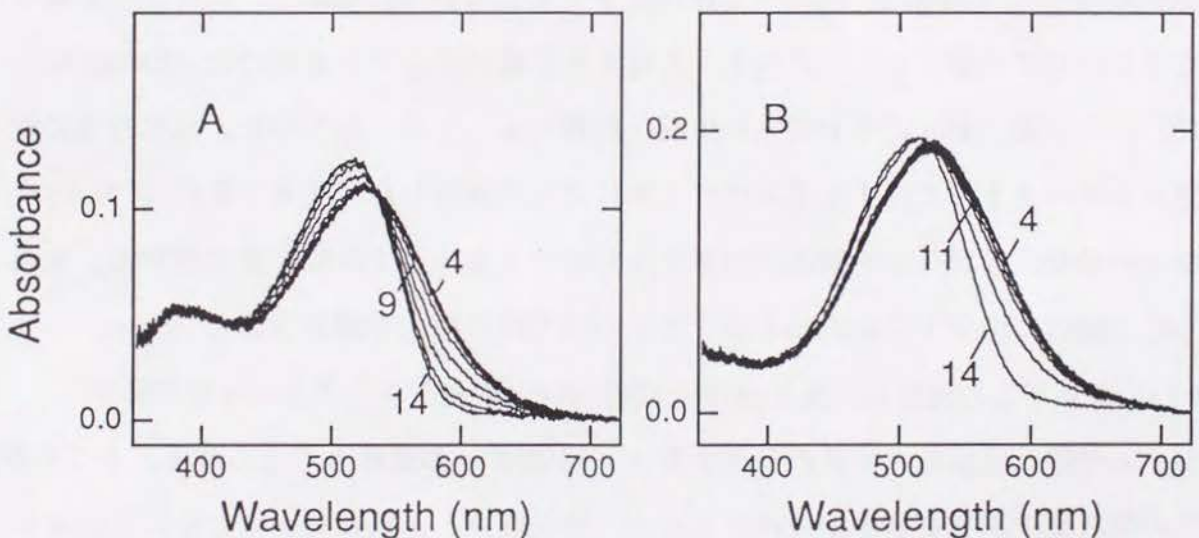


図3-5 バソ中間体からルミ中間体への遷移過程

Green試料 (A) またはロドプシン試料 (B) に -185°C で緑色光 (501 nm) を120秒間照射することによりバソ中間体を多く含む光平衡混合物 (curve 4, 図3-5と共通) を生成した。この試料の温度を、 -185°C から順に -180°C 、 -170°C 、 -160°C 、 -150°C 、 -140°C 、 -130°C 、 -120°C 、 -110°C 、 -100°C 、 -90°C まで上げ、その都度 -185°C まで冷却して、それらのスペクトルを測定した (curves 5-14)。スペクトルは短波長側にシフトした。

3-3-3 ルミ中間体からメタI中間体へ

(発色団から蛋白質全体への情報伝達)

ルミ中間体は、室温ではマイクロ (10^{-6}) 秒の時間領域で、また、低温では、 -40°C 前後で次の中間体であるメタI中間体に変化する。この過程は、発色団周辺の蛋白質の構造のゆがみとして蓄えられた光情報が、蛋白質全体の構造が緩和することにより、次の段階へ伝達される過程であると考えられる (Imai et al., 1994)。この伝達過程がロドプシンと錐体光受容蛋白質で異なるかどうかは、情報の蛋白質内伝達過程を考える上で興味深い問題である。そこで、Greenとロドプシンのルミ中間体からメタI中間体への変化過程を、時間分解低温分光法により吸収スペクトルの時間変化として観測、解析した。

-40°C に保った試料に橙色光 ($>570\text{nm}$) を30秒間照射した後、暗中所ける吸収スペクトルの時間変化を測定した。照射直後に測定したスペクトル (curve 2) は、照射前のもの (curve 1) に比べて短波長シフトしていた。そして、温度設定を保ったまま暗中で静置すると、スペクトルはさらに短波長シフトを続けた (curves 3-13)。この変化が、どの中間体の生成、崩壊によって起こるのかを、照射直後に測定したスペクトルに対する差スペクトルによって検討した (図6-3a')。ロドプシンの場合、崩壊した中間体に由来する530 nmを極小とする吸光度の減少と、生成した中間体に由来する460 nmを極大とする吸光度の増大が観測された (curves 3'-9')。よってこの反応は、500 nm付近に吸収極大波長が存在するルミ中間体から、480 nm付近に吸収極大波長が存在するメタI中間体への遷移と考えられる。ところが、この吸収変化過程を示す差スペクトルは、等吸収点、正負のピークともに、徐々に短波長シフトしていた。この現象は、ここで観測された反応が、二つの中間体間の遷移だけではないことを示唆している。実際に、SVD法を用いた吸収スペクトル解析によって、ニワトリロドプシンでは、ルミ中間体とメタI中間体の遷移過程に別の中間体が存在することがわかり、LM中間体と名付けられている (Shichida et al., manuscript submitted)。

一方、Greenの場合には、吸収スペクトルの変化過程は、一つの等吸収点を通り、正負のピークの移動も見られなかった。このことから、Greenではルミ中間体からメタI中間体への変化過程は一成分であり、別の中間状態は存在しないと結論した。すなわち、ルミ中間体からメタI中間体に至る蛋白質内の構造変化に伴う情報伝達過程において、ロドプシンは複数の状態を経由し、Greenは直接遷移が起こるということがわかった。また、ルミ中間体からメタI中間体への吸収変化過程を示す差スペクトルの、正負のピークの位置に注目すると、ロドプシンでは460 nmと545 nmに存在する正負のピーク (curve 3) が、Greenでは、440 nmと525 nm (curve 3) に位置している。Greenとロドプシンのルミ中間体の吸収極大波長はほぼ同じなので、この差スペクトルのピークの位置の20 nmの違いは、GreenのメタI中間体の吸収極大波長がロドプシンのメタI中間体よりも約20 nm短波長シフトしていることを示唆している。すなわち、メタI中間体になると、ルミ中間体では見られなかったGreenとロドプシンの発色団をとりまく環境の違いが現れると考えられる。

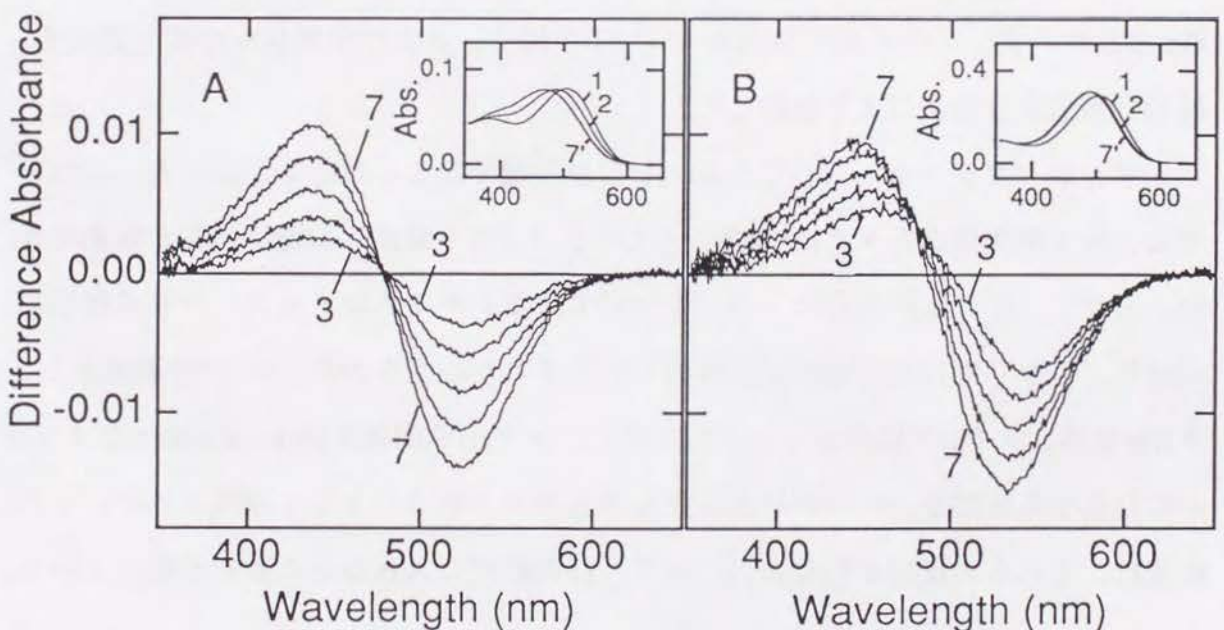


図3-6 ルミ中間体からメタI中間体への遷移過程

-40℃に保ったGreen試料 (A) またはロドプシン試料 (B) (curves 1) を橙色光 (>570nm) で30秒間光照射し、直後にスペクトルを測定した (curves 2)。その後試料を同じ温度で2分、4分、8分、16分、32分、暗保してスペクトルを測定した (内挿図, curves 1-7)。curves 3-7からcurve 2を引くことによって計算した差スペクトル (curves 3-7) を示した。

3-3-4 メタI中間体からメタII中間体、メタIII中間体へ

(酵素活性機能の発現と停止)

(a) 吸収スペクトルによる解析

メタI中間体はミリ秒の時間領域で、発色団と蛋白質を結ぶシッフ塩基が脱プロトン化して、380 nm付近に吸収極大波長を示すメタII中間体、さらに、秒の時間領域で、シッフ塩基が再プロトン化して、480 nm付近に吸収極大波長を示すメタIII中間体に至る (Matthews et al., 1963)。これらの中間体の中で、メタII中間体がトランスデューシンを活性化する中間体であることが示されている (Fung et al., 1981; Bennet et al., 1982; Kibelbek et al., 1991)。すなわち、メタII中間体の段階では、トランスデューシンと相互作用する蛋白質表面の構造ができあがり、発色団に始まった蛋白質内の情報伝達過程は、ここに至って蛋白質表面に到達するのである。この、蛋白質の酵素活性機能発現の様相を錐体光受容蛋白質とロドプシンで比較するために、GreenとロドプシンのメタI中間体からメタII中間体、メタIII中間体への変化過程を、時間分解低温分光法により検討した。

まず、ロドプシンで、 -30°C から -10°C の領域で起こる反応を検討した。 -30°C では、ルミ中間体からメタI中間体、そして、メタII中間体への遷移過程が観測できた。しかし、これらの反応はきれいに分離することができなかった。それに対して、 -20°C 、 -10°C では変化過程が段階的に観測された。すなわち、メタI中間体からメタII中間体、メタII中間体からメタIII中間体、メタIII中間体がall-trans-retinalとオプシンに分解する反応が、一つの等吸収点を通る差スペクトルとして観測された。この結果は、これらの反応が順番におこって、別の経路に入らないことを示唆している。

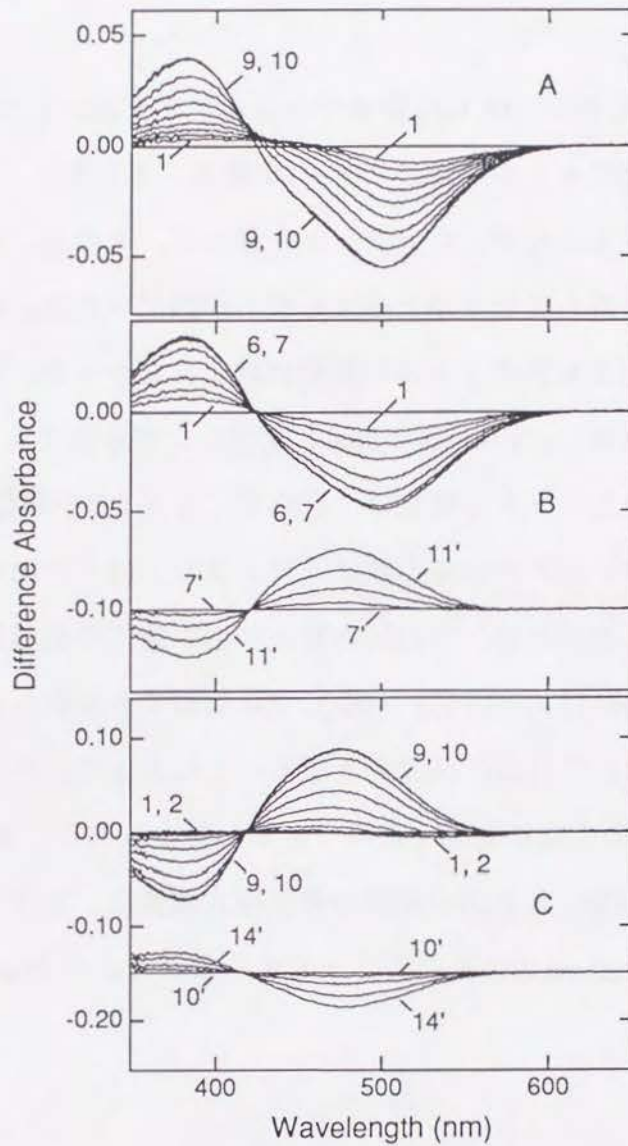


図3-7 ロドプシンのメタI中間体からメタII中間体、メタIII中間体への遷移過程

-30 °C (A)、-20 °C (B)、-10 °C (C) に保ったロドプシン試料を、橙色光 (>570nm) で30秒間光照射し、直後にスペクトルを測定した。その後、試料を同じ温度で2分、4分、8分、16分、32分、64分、128分、256分、512分、1024分、2048分、4096分、8192分、15424分、暗保してスペクトルを測定した。(A) 光照射後2-1024分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-10) を示した。(B) 上段: 光照射後2-128分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-7) を示した。下段: 光照射後128-2048分後に測定したスペクトルから、128分後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 7'-11') を示した。(C) 上段: 光照射後2-1024分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-10) を示した。下段: 光照射後1024-15424分後に測定したスペクトルから、1024分後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 10'-14') を示した。

次にGreenで、 -30°C から -10°C の領域で起こる反応を検討した。 -30°C では、まず、ロドプシンと同様にルミ中間体からメタI中間体、そして、メタII中間体への遷移過程が観測できた。ところが、ロドプシンと違って、その後、 460 nm 付近の吸光度が減少し、 380 nm 付近の吸光度が上昇する反応が観測された。変化が終わった後、温度を $+20^{\circ}\text{C}$ まで上げててもスペクトルの変化は起こらなかった。そのため、この最後の反応は中間体が崩壊し、all-trans-retinalとオプシンが分解する反応である可能性が考えられた。同様のスペクトル変化は、 -20°C でもメタII中間体の生成後に観測された。これらのスペクトル変化の形状は、ロドプシンのメタIII中間体が崩壊する変化によく似ている。そのため、この反応をメタIII中間体の崩壊過程と同定した。メタIII中間体の生成過程は、 -30°C 、 -20°C では観測できなかったが、 -10°C では観測することができた。これは、温度を下げることによって、メタIII中間体の生成の速さがメタII中間体の生成に近づくためであると考えられる。吸収スペクトル的に見ると、GreenのメタII、メタIII中間体の吸収極大波長は、ロドプシンのメタII、メタIII中間体よりも約 20 nm 短波長にシフトしていることがわかる。

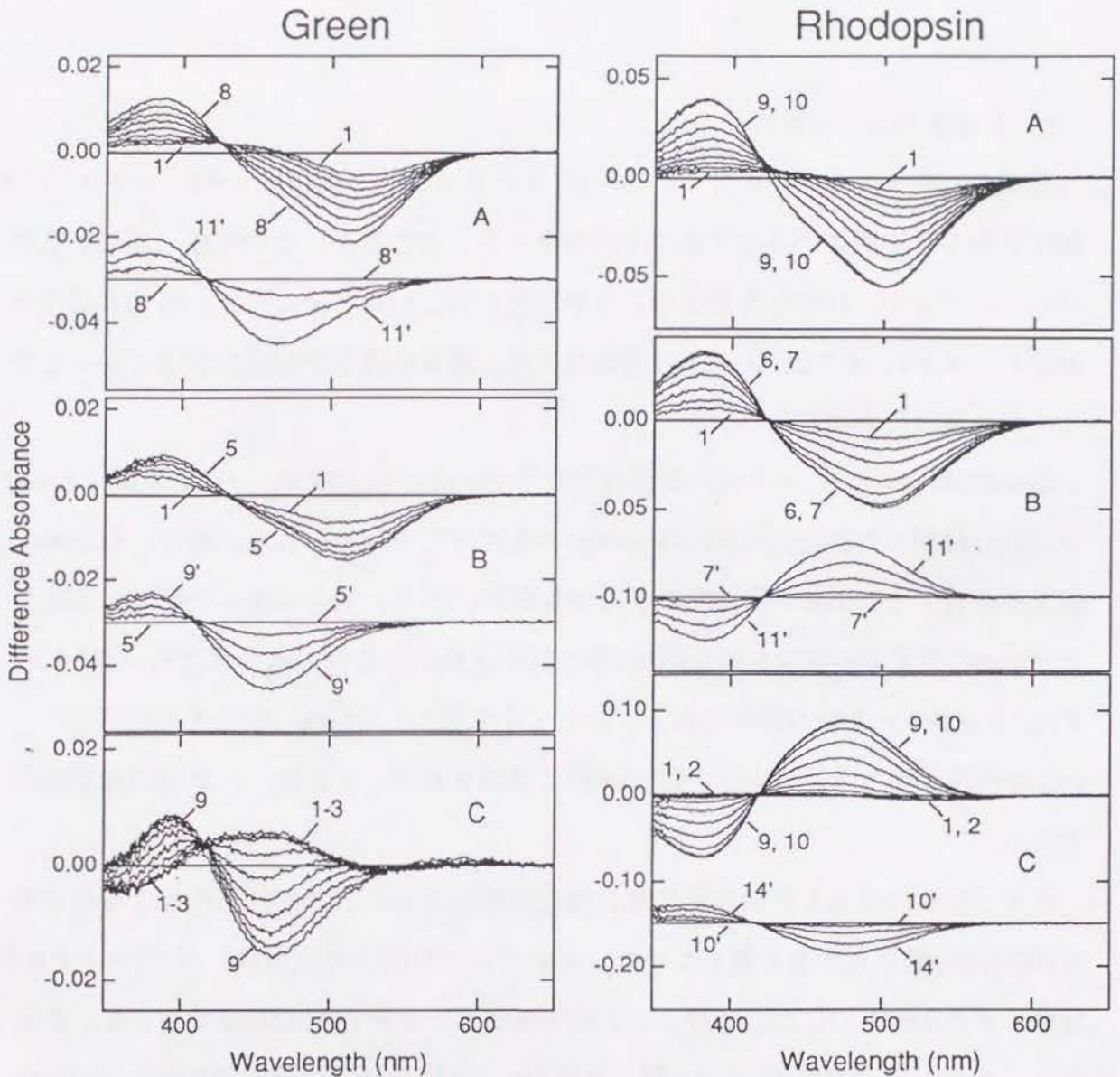


図3-8 GreenのメタI中間体からメタII中間体、メタIII中間体への遷移過程

-30℃ (A)、-20℃ (B)、-10℃ (C) に保ったGreen試料を、橙色光 (>570nm) で30秒間光照射し、直後にスペクトルを測定した。その後、試料を同じ温度で2分、4分、8分、16分、32分、64分、128分、256分、512分、1024分、2048分、暗保してスペクトルを測定した。(A) 上段: 光照射後2-256分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-8) を示した。下段: 光照射後256-2048分後に測定したスペクトルから、256分後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 8'-11') を示した。

(B) 上段: 光照射後2-32分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-5) を示した。下段: 光照射後32-512分後に測定したスペクトルから、32分後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 5'-9') を示した。(C) 光照射後2-512分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-9) を示した。右側には、対応する温度のロドプシンのスペクトル変化 (A'-C') を示した (図3-7参照)。

(b) 反応速度による解析

吸収スペクトルの測定により、Greenでもロドプシンと同様にメタI、メタII、メタIII中間体の各中間体が存在することがわかった。ところが、その生成、崩壊の条件が、ロドプシンとはかなり異なることが示唆されている。そこで、 -10°C に温度を固定し、メタI、メタII、メタIII中間体の生成、崩壊の速度が実際にロドプシンとどのくらい違うのか検討した。

Greenでは、メタI、メタIII中間体の挙動を450 nmの吸光度で、メタII中間体とオプシンから遊離したall-trans-retinalを380nmの吸光度でモニターした。最初に450nmの吸光度の減少と380nmの吸光度の増大が時定数6.7秒で、次に450nmの吸光度の増大と380nmの吸光度の減少が時定数100秒で観測された。これらはそれぞれメタI→メタII、メタII→メタIIIの反応である。そしてその後に、470nmの吸光度の減少と380nmの吸光度の増大が、時定数2,300秒で観測された。これは、メタIIIの崩壊反応である。

ロドプシンの場合も同様の吸光度の変化が観測されたが、それらの起こる時間領域がGreenの場合とかなり違っていた。それぞれの反応の時定数は、メタI→メタIIで25秒、メタII→メタIIIで5,300秒、メタIIIの崩壊反応は約1,000,000秒であった。すなわち、メタI→メタIIの反応は約4倍、メタII→メタIIIの反応は約50倍Greenの方が速いことがわかった。また、メタIIIの崩壊反応は約400倍Greenの方が速いことがわかった。このようなメタII中間体の生成、崩壊がロドプシンよりも速いことは、Redでも観測されている (Shichda et al., 1993; Okada et al., 1994)。メタII中間体はトランスデューシンを活性化する中間体であるため、その生成、崩壊の速度はそれぞれ、トランスデューシンの活性化開始時間、活性化効率に影響を与える可能性がある。この可能性については、後に詳しく考察したい。

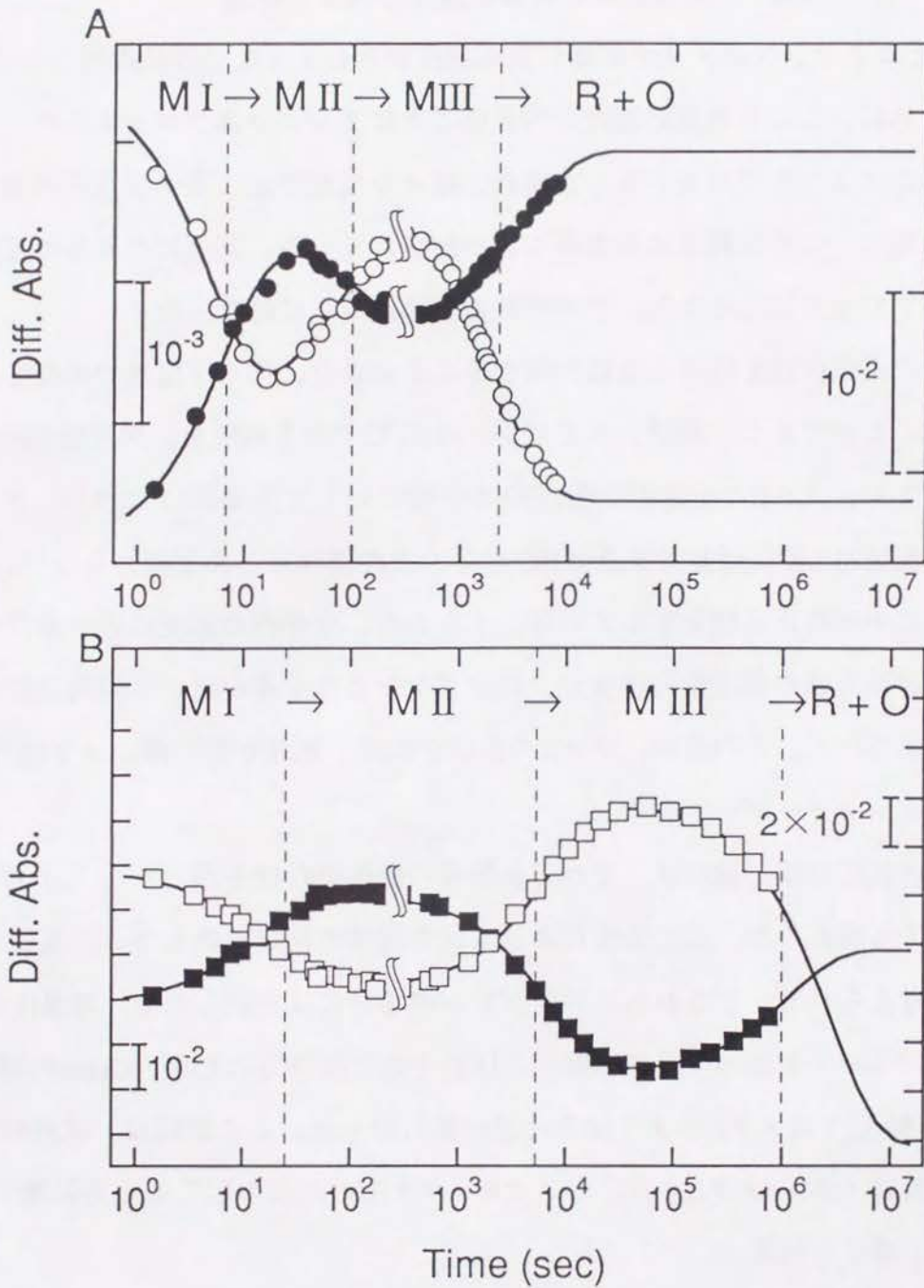


図3-9 -10°C におけるメタI、メタII、メタIII中間体の崩壊速度

Green試料 (A) またはロドプシン試料 (B) に -8°C で橙色光 ($>570\text{nm}$) で30秒間光照射し、この温度で、その後の450 nm (Green, \circ) または500 nm (ロドプシン, \square) と、380 nm (Greenは \bullet 、ロドプシンは \blacksquare) の吸光度の時間変化をモニターした。300秒までの変化と、それ以降の変化を別々に測定し、300秒の吸光度で合わせた。横軸の光照射後の時間は、対数でプロットしている。曲線は、これらの変化を指数関数で近似したものである。縦の破線は、それぞれの変化に対応する時定数を示している。

(C) メタI、メタII、メタIII中間体の崩壊速度の温度依存性

Greenとロドプシンのメタ中間体の反応速度がどのような温度依存性を示すのかを調べるために、これらの反応速度を各反応ごとにアレニウスプロットした(図3-10)。このようなプロットをした場合、様々な温度で起こる一次反応の速度定数は、近似的に一つの直線上に連なることが知られている。実際にこれらの反応の速度定数をプロットしたところ、それぞれの値は直線状に連なった。

これらの近似直線を外挿または内挿することにより、様々な温度での反応速度を予測することができる。実際、ロドプシンの20℃での予測値を、閃光分解法の結果と比較しても、メタIIの生成が予測値30ミリ秒に対して実測値12ミリ秒、メタIIの崩壊が予測値210秒に対して実測値180秒と、その値はほとんど変わらない。この結果は、この手法の正当性を示している。すなわち、生体内の温度に近い条件でも、錐体光受容蛋白質の構造変化速度が、ロドプシンよりも速いという傾向は変わらないことが示された。その差は、メタIIの生成が数倍、崩壊が数十倍、メタIIIの崩壊が数百倍というオーダーである。

また、各反応の反応速度は、それぞれ特有の温度依存性を示した。(a) 吸収スペクトルによる解析の際、温度条件によっては中間体の同定が難しかった原因はここにあると考えられる。すなわち、ロドプシンの場合には実験した全ての温度領域でメタI→メタII→メタIIIの反応が段階的に区別されて観測されたが、Greenの場合には、-20℃、-30℃ではメタII→メタIIIの確認が難しかった。この原因は、試料の温度を下げると共にメタI→メタIIの反応とメタII→メタIIIの反応の起こる時間領域が近づいたためと考えられる。

実際、図3-10に示したようにGreenのメタI→メタIIとメタII→メタIIIの速度定数は、-20℃付近で同一になる。-10℃では、メタI→メタIIの反応が、メタII→メタIIIの反応とは別の時間領域で起こる。しかし-20℃以下では、両者の時間領域が接近して反応が同時に起こっているため、メタIIIの生成に伴うメタIIの崩壊が観測できないことがわかる。

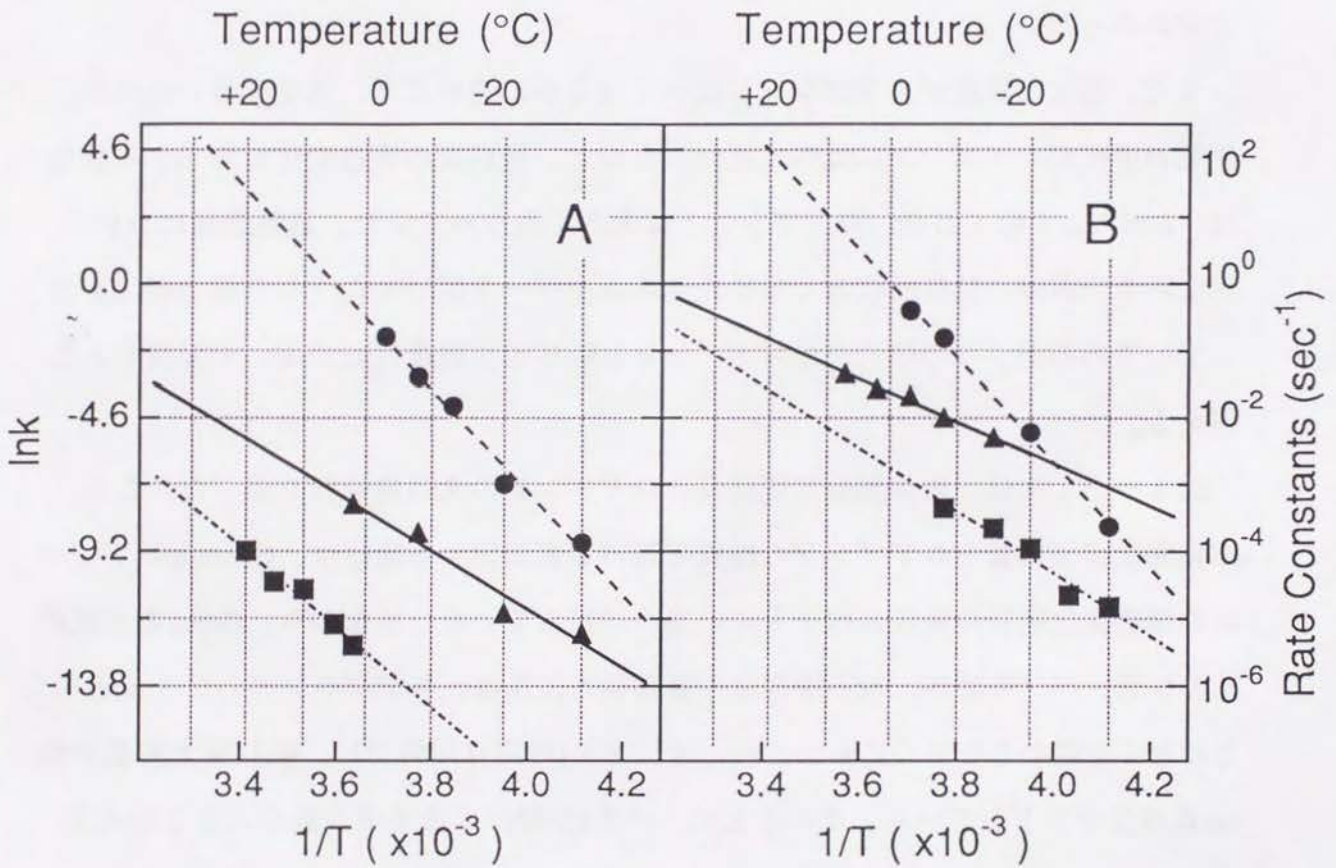


図3-10 メタI、メタII、メタIII中間体の崩壊速度の温度依存性

ロドプシン (A)、Green (B) のメタI (●)、メタII (▲)、メタIII (■) 中間体の崩壊速度を、様々な温度で求め、アレニウスプロットした。この場合、横軸は絶対温度の逆数であるが対応する温度も同時に示した。また、縦軸は速度定数の自然対数であるが、対応する時定数も同時に示した。

3-4 錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違い

本章で検討したGreenの様々な性質を、ロドプシン、Redと比較してまとめた（表3-1）。

まず、Greenの光化学的な性質は、ロドプシンに非常によく似ていた。Redも同様な性質を示すため、ロドプシンでも錐体光受容蛋白質でも、高い光感受性と大きな分子吸光係数という性質は共通に持っていると考えられる。すなわち、光受容蛋白質は、光を効率よく吸収するための仕組みを、基本的な性質として保持していることがわかった。

また、再生の速度がロドプシンに比べてはるかに速いこと、光受容後の構造変化過程の速度がロドプシンに比べて速いことなど、蛋白質の構造変化に由来する機能は、Redとよく似ており、ロドプシンとは大きく異なっていた。退色過程において光受容蛋白質は、発色団に蓄えられた光エネルギーを用いてこうした構造変化をおこすのであるが、この時点からロドプシンと錐体光受容蛋白質の違いが発現すると言える。

図3-11には、錐体光受容蛋白質とロドプシンの光退色過程を示した。この、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いが表面化する段階は、Greenとロドプシンの構造変化過程の吸収スペクトルの違いに表れている。すなわち、Greenの光反応前の状態、バソ中間体、ルミ中間体の吸収極大波長は、ロドプシンの対応するものとほとんど変わらないのにもかかわらず、メタI中間体以降では、吸収極大波長が20 nm短波長シフトしている。このことは、メタI中間体以降で蛋白質の大きな構造変化が起こり、Greenとロドプシンの違いが発現したことを示唆している。中間体の崩壊速度の違いが表れるのも、主にこの段階以降であるので、錐体光受容蛋白質とロドプシンの違いは、メタI中間体以降で主に発現するのであろう。

表3-1 ロドプシン、Green、Redの性質の比較

光受容蛋白質の性質	静的性質	動的性質
光化学的性質	分子吸光係数 ロドプシン=Green=Red	光感受性 ロドプシン=Green=Red
光反応過程	吸収スペクトル	崩壊過程
バソ中間体	ロドプシン=Green≠Red	ロドプシン≠Green≠Red
ルミ中間体	ロドプシン=Green≠Red	ロドプシン≠Green≠Red
メタI中間体	ロドプシン≠Green≠Red	ロドプシン≠Green=Red
メタII中間体	ロドプシン≠Green≠Red	ロドプシン≠Green=Red
メタIII中間体	ロドプシン≠Green≠Red	ロドプシン≠Green≠Red
再生速度		ロドプシン≠Green=Red

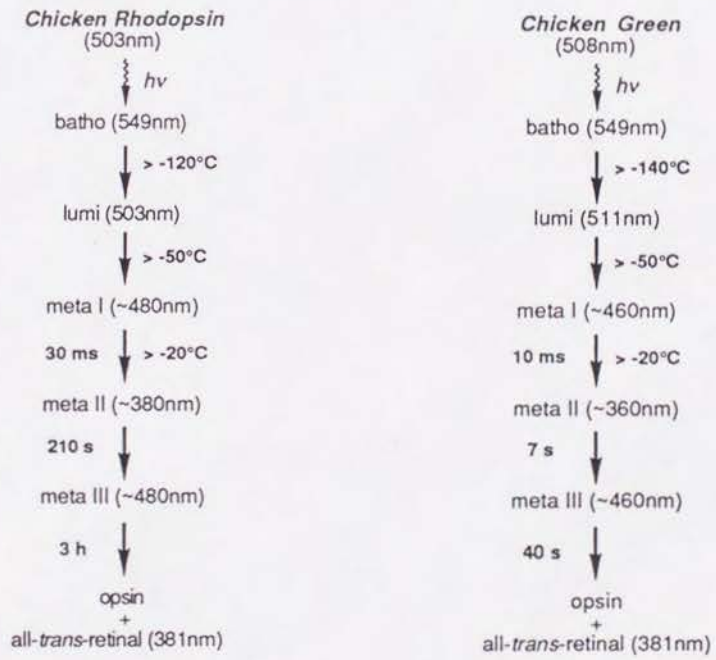


図3-11 ロドプシンとGreenの退色過程

各中間体間の遷移を表す矢印の右側に遷移温度を、左側に計算により予測された室温での時定数を、それぞれ記した。

第四章

両者の性質の違いを生み出す分子内の機構

第三章では、Greenとロドプシン、Redの性質を比較検討し、錐体光受容蛋白質に特有な性質を探し出した。その結果、メタ中間体の崩壊速度と、再生速度がそれぞれ速いことが、錐体光受容蛋白質に特有な性質であることがわかった。そこで、本章では、両者の性質の違いを生み出す分子内の機構を明らかにする。まず、熱力学的、蛋白化学的側面からメタ中間体の崩壊速度が速い原因を探ってゆく。また、その結果に基づいて、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いが、どのようなアミノ酸残基の違いに由来するのか推定する。そして、その部位を改変したロドプシン変異体を作成して、その性質（メタII中間体の崩壊速度、再生速度）が錐体光受容蛋白質型になるかどうか検討する。なお、本章の内容は、主論文2（Imai et al., 1995）、主論文3（Imai et al., manuscript submitted）として、添付してある。

4-1 構造変化の活性化エネルギー

第三章で示された、メタ中間体の崩壊速度の違いを熱力学的に解析するために、アレニウスプロット上の速度定数の値を、最小二乗法を用いて直線で近似した。そして、その直線の傾きから式[2]により、活性化エンタルピー（ ΔH^\ddagger ）を算出した。また、近似した直線から求めた0℃の速度定数の値を用いて、式[1]から0℃における活性化自由エネルギー（ ΔG^\ddagger ）を算出した。そして、それらの値から式[3]により活性化エントロピー（ ΔS^\ddagger ）を算出した。それらの値を表4-1に示す。

Green、ロドプシンともにメタI→メタIIの活性化エンタルピーは、他の2つの反応に比べて大きな値を示した。また、この反応の活性化エントロピーも大きな値を示した。いずれの性質も、メタIからメタIIへ変化するときに蛋白質の大きな構造変化が起こることを示している。また、Green、ロドプシンともにメタII→メタIIIの活性化エントロピーは負の値を示した。以上の結果は、中間体間の遷移の熱力学的な性質が、Greenとロドプシンでよく似ていることを示している。

一方、GreenのメタII→メタIIIの反応とメタIIIの崩壊反応の活性化エンタルピーは、ロドプシンの場合に比べて5~6kcal/mol小さな値を示した。この差を活性化エネルギー

の差と仮定すると、反応速度は10,000～63,000倍違ってくる。したがって、GreenのメタIIおよびメタIIIがロドプシンのそれらよりも速く崩壊するのは、活性化エンタルピーが小さいことに起因する。一方、活性化エントロピーの差はむしろGreenとロドプシンとの間の速度差を小さくすることがわかった。

構造変化の反応速度の違いは、熱力学的には遷移状態と基底状態のエネルギーの差を反映する。これらの状態を規定するのは、共有結合の変化、水素結合の強度変化や切断などなので、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の違いは、こうした部分にあるのだろう。すなわち、反応の速度が大きい錐体光受容蛋白質の分子内の結合には変化が起こりやすいと考えられる。錐体光受容蛋白質が、ヒドロキシルアミンなどの薬剤に対して感受性が高いのも、こうした原因によるものと思われる。

表4-1 メタII、III中間体の生成、崩壊の熱力学的パラメータの算出

	ロドプシン		Green	
	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
	(kcal/mol)	(cal/mol/deg)	(kcal/mol)	(cal/mol/deg)
メタIIの生成	34.7 (2.4)	66.3 (9.5)	35.7 (1.4)	72.5 (5.3)
メタIIの崩壊	19.3 (3.0)	-3.2 (11.8)	14.0 (0.9)	-14.6 (3.5)
メタIIIの崩壊	26.8 (2.8)	14.7 (10.0)	20.8 (2.7)	5.1 (10.5)

() 内は、それぞれの値の標準偏差

$$\ln k = -(\Delta G^\ddagger/RT) + \ln (k_B T/h) \quad [1]$$

$$\ln k = -(\Delta H^\ddagger/R)(1/T) + (\Delta S^\ddagger/R) + \ln (k_B T/h) \quad [2]$$

$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger) / T \quad [3]$$

k: 速度定数; R: 気体定数; T: 絶対温度; k_B : ボルツマン定数; h: プランク定数

4-2 構造変化の速度に対するpHの効果

このように、メタI中間体以降で、錐体光受容蛋白質とロドプシンの違いが現れることがわかった。この項以降では、この違いを生み出す分子機構を検討した。光受容蛋白質の一次構造から、各解離性アミノ酸残基の個数と解離定数を用いて、総電荷を計算することができる。光受容蛋白質においては、Greenを含む錐体光受容蛋白質は、塩基性アミノ酸残基が多いために中性で正に荷電し、ロドプシンは、酸性アミノ酸残基が多いために中性で負に荷電していると予想されている (Okano et al., 1992a)。実際、Greenを含む錐体光受容蛋白質は陽イオン交換カラムに吸着し、ロドプシンは陰イオン交換カラムに吸着するので、この予想は基本的には正しいと考えられる。この、総電荷の違いが、Greenとロドプシンで大きく異なるメタIIの崩壊速度とどのように関係しているのかを、時間分解低温分光法により検討した。

蛋白質を構成するアミノ酸は、pHを変化させることによって解離状態が変化し、総電荷を変化させる。計算によると、Greenの試料をpH 10付近のアルカリ性にするると負電荷を持つようになり、中性におけるロドプシンと同程度の総電荷を持つと予想される。そこで、実際にGreenおよびロドプシンの試料をpH 10のアルカリ性にして、-10℃でメタII中間体の崩壊速度を測定した。GreenはRedとは異なり (Wald et al., 1955)、pH 10でも吸収スペクトルにほとんど変化がなかったので、変性したりせずに安定であると考えられた。そこで、この試料に-10℃で光照射し、その後のメタII中間体の崩壊とメタIII中間体の生成に伴う吸収スペクトルの変化を測定した。Greenでは、メタII中間体の崩壊速度は約7倍遅くなった。一方、ロドプシンのメタII中間体の崩壊速度は約3倍速くなった。この速度の差をより明確に示すために、光照射後の時間に対する380 nmの吸光度の変化をプロットした。pH 10のGreenのメタII中間体の崩壊速度が、pH 7またはpH 10のロドプシンのメタII中間体の崩壊速度とほぼ同程度になることが読みとれる。この時点では、pHを10にしたことによって蛋白質に不可逆的な変化が起こり、上記の現象が観測された可能性が残っている。この可能性を否定するために、一旦pHを10にして、その後再びpH 7に戻した試料のメ

タII中間体の崩壊速度を測定した。その結果、この試料のメタII中間体の崩壊速度は、もとのpH 7の試料と同程度の崩壊速度を示すことがわかった。すなわち、試料をアルカリ性にすることによって観測されたメタII中間体の崩壊速度の変化は、蛋白質に不可逆的な変化が起ったからではなく、純粋にpHの変化によって起こされたことが示された。これらの結果は、メタII中間体の崩壊速度に代表される錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いが、解離性アミノ酸残基の違いによることを示唆している。

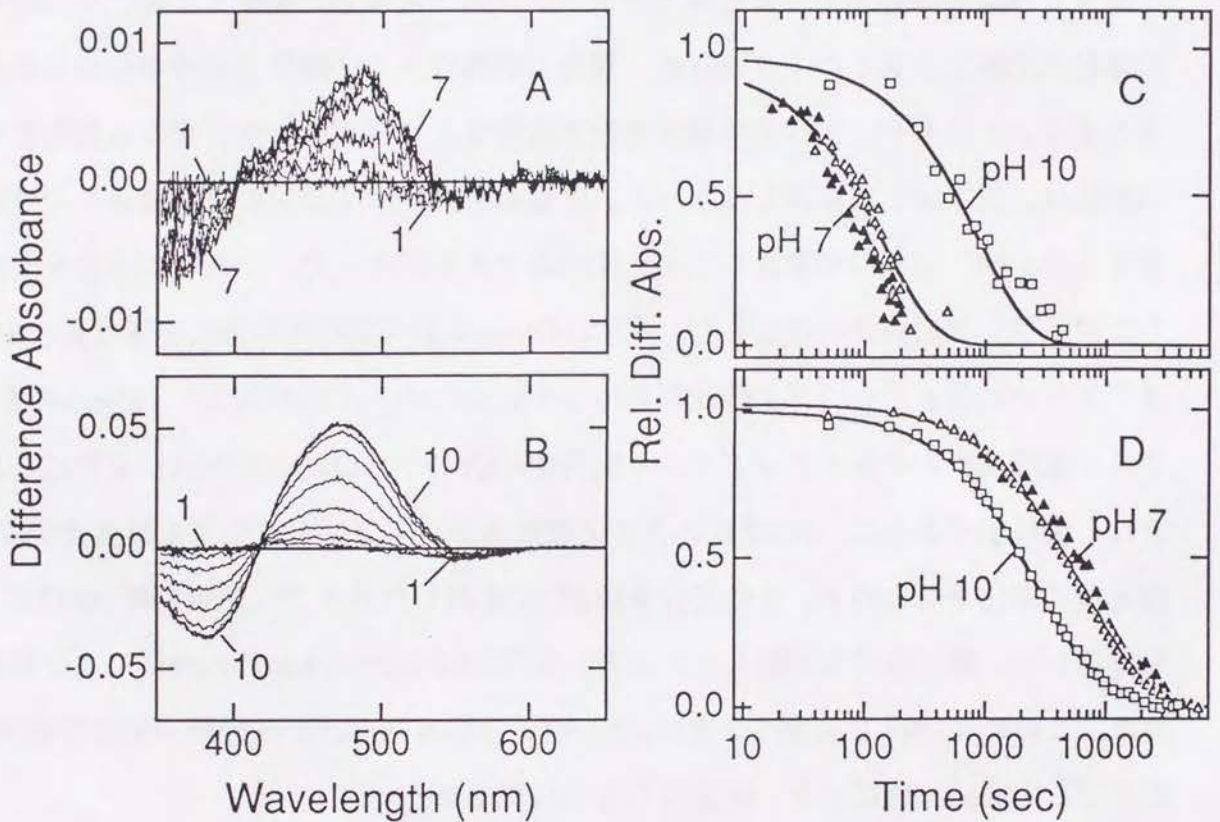


図4-1 メタIIの崩壊速度に対するpHの効果

(A, B) -10℃に保ったGreen試料 (A) またはロドプシン試料 (B) を橙色光 (>570nm) で30秒間光照射し、直後にスペクトルを測定した。その後試料を同じ温度で2分、4分、8分、16分、32分、64分、128分、256分、512分、1024分、暗保してスペクトルを測定した。光照射後2-1024分後に測定したスペクトルから、光照射直後に測定したスペクトルを引くことによって計算した差スペクトル (curves 1-10) を示した。(C, D) Green試料 (C) またはロドプシン試料 (D) の380 nmの吸光度の変化を、照射後の時間に対してプロットした。□、△はそれぞれ、pH 7、pH 10の試料での結果を示す。▲は、一度pH 10にした試料を再びpH 7に戻した試料での結果を示す。

4-3 錐体光受容蛋白質の性質を持つ部位特異的変異ロドプシン

4-3-1 部位特異的変異部位の選択

錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いを生み出す分子内のメカニズムとして、前節で解離性アミノ酸残基の関与が示唆された。そこで、解離性アミノ酸残基に注目し、錐体光受容蛋白質とロドプシンで異なる部分を入れ替えた部位特異的変異ロドプシンを作成して、その性質を調べた。

様々な種類の錐体光受容蛋白質とロドプシンの一次構造を比較した時、それぞれの錐体光受容蛋白質とロドプシンが、異なる解離性アミノ酸残基を持つ部位は多数存在する。ところが、すべての錐体光受容蛋白質とロドプシンが、異なる電荷を持つ部位は、三ヶ所しか存在しなかった。すなわち、ロドプシンのN末端からの残基番号上で、64、122、150番目のアミノ酸残基である。そこで、これらの部分を改変したロドプシン変異体を設計した。まず、Greenはすべての錐体光受容蛋白質の中でロドプシンに最も近いアミノ酸配列を持っているので、上記の部分を、Greenのもつアミノ酸残基に入れ替えたロドプシン変異体（Q64K、E122Q、E150A）を作成した。また、後に示すように、122番目のアミノ酸残基がロドプシンの性質を錐体光受容蛋白質型に変化させたので、この部分をRed型に変換したロドプシン変異体（E122I）も作成した。第二章にも記述したとおり、変異DNAはPhosphorothioate法により作成した。この変異DNAを発現ベクターpUC-SR α に組み込み、ヒト腎臓由来の培養細胞系である293S細胞により、変異蛋白質を発現させた。

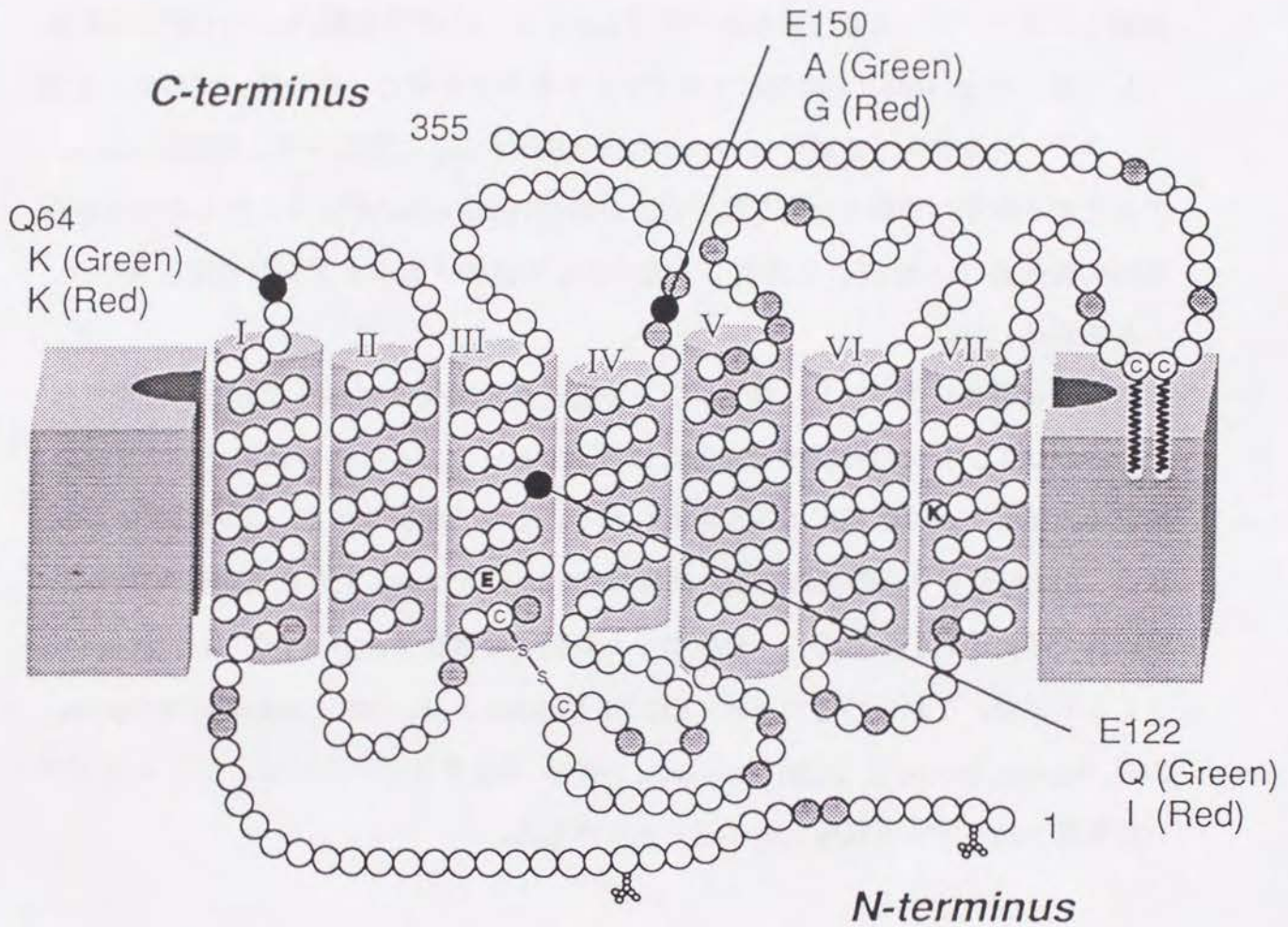


図4-2 解離性アミノ酸残基における錐体光受容蛋白質とロドプシンの違い

ロドプシンのモデル (Hargrave et al., 1983) 上で、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の一次構造を比較した。解離性アミノ酸残基において、それぞれの錐体光受容蛋白質とロドプシンの異なる部分を◎で、すべての錐体光受容蛋白質とロドプシンの異なる部分を●で示した。その他の残基は○で示した。今回置換した残基については、鋳型であるロドプシンの残基を一文字表記でN末端からの順番とともに表した。また、それぞれに対応するGreenとRedの残基を同様に一文字表記で表した。

4-3-2 部位特異的変異ロドプシンの吸収スペクトル

まず、培養細胞により発現した部位特異的変異ロドプシンの吸収スペクトルを測定し、吸収極大波長を決定すると共に、生成したロドプシンの量を定量した。まず、発現したロドプシンの蛋白質部分（オプシン）を、界面活性剤CHAPSを用いて可溶化した後、11-cis-retinalを添加してロドプシンを再生させた。その後、試料にヒドロキシルアミンを加えて遊離の11-cis-retinalをretinal oximeに変化させ、光照射によって変化する成分への寄与を取り除いた。遊離の11-cis-retinalが完全に無くなってから試料に黄色光（>500 nm）を照射し、光によって退色するロドプシンの吸収スペクトルを測定した。

網膜から調製したニワトリロドプシンの吸収極大波長は503 nmであるが、発現した野生型ロドプシンの吸収極大波長は507 nmであった。この違いは、ロドプシンの周囲の膜脂質などの影響によると考えられる。また、変異ロドプシンの吸収極大波長は、E122Q変異体以外は野生型と同様に500 nm付近であった。E122Q変異体は、吸収極大波長が486 nmであり、野生型または他の変異体に比べて約20 nm短波長シフトしていた。これらの値のうち、E122Q（Sakmer et al., 1989; Zhukovsky & Oprian, 1989, Nathans, 1990b）、E122I（Nathans, 1990a）の変異体については、ウシロドプシンで報告されている吸収極大値と近い値を示した。

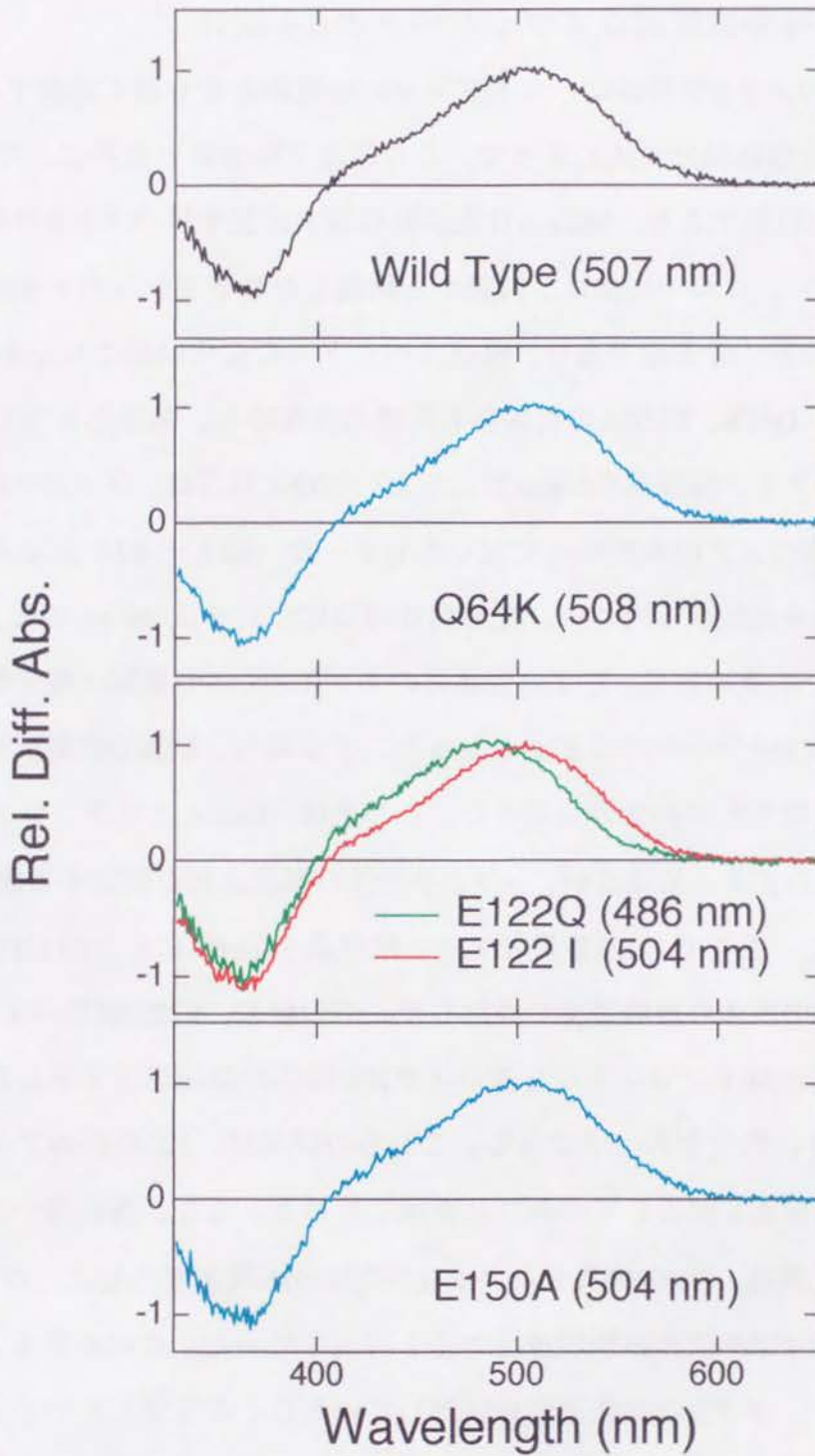


図4-3 培養細胞により発現したロドプシンの吸収スペクトル

野生型 (A)、および、変異体 (B-D) のロドプシンの吸収スペクトルを、レチナールオキシムとの差スペクトルとして示した。実際には、4℃においてヒドロキシルアミン (10 mM) 存在下で、試料を光照射 (> 500 nm) した。光照射前の吸収スペクトルから光照射後の吸収スペクトルを引いた差スペクトルを計算し、それぞれの吸収極大波長の吸光度を1として規格化した。

4-3-3 部位特異的変異ロドプシンのメタII中間体

錐体光受容蛋白質のメタII中間体は、ロドプシンの中間体よりも速く崩壊する。そこで、まず、時間分解低温分光法によって、この速度を野生型と変異体とで比較した。2℃で試料を光照射すると、380 nm付近に吸収極大波長を持つメタII中間体が生成した(図4-4a)。この中間体は、網膜から調製したロドプシンのメタII中間体と同様にこの条件で数十分安定であり、吸収スペクトルの変化は起こらなかった。ここには表さないが、Q64K、E150Aの変異体も同様の光反応と、熱反応を示した。ところが、122番目のアミノ酸残基をGreen型にしたE122Q変異体は、メタII中間体は生成したが、数分で次のメタIII中間体に変化してしまった(図4-4b)。この、メタII中間体の崩壊速度を比較するために、光照射後の時間に対する460 nmの吸光度の変化をプロットした。その結果、E122Q変異体のメタII中間体の崩壊は時定数3.3分で起こり、野生型は180分かかることがわかった。すなわち、E122Q変異体のメタII中間体の崩壊は、野生型の約50倍速かった。この差は、Greenとロドプシンの差に近いので、122番目のアミノ酸残基が、メタII中間体の崩壊速度を制御する因子であることが考えられた。そこで、122番目のアミノ酸残基をRed型にしたE122I変異体についても、メタII中間体の崩壊速度を検討した。その結果、E122I変異体もE122Q変異体と同様に、ロドプシンよりも速いメタII中間体の崩壊速度を示した。その時定数は12分であり、野生型の15倍である。これらの結果は、122番目のアミノ酸残基が、メタIIの崩壊速度を制御していることを示している。また、興味深いことに、野生型、E122Q変異体、E122I変異体のメタII中間体の崩壊速度の差は、ロドプシン、Green、RedのメタII中間体の崩壊速度の差を再現していた。この結果も、122番目のアミノ酸残基が、メタIIの崩壊速度を制御していることを支持している。

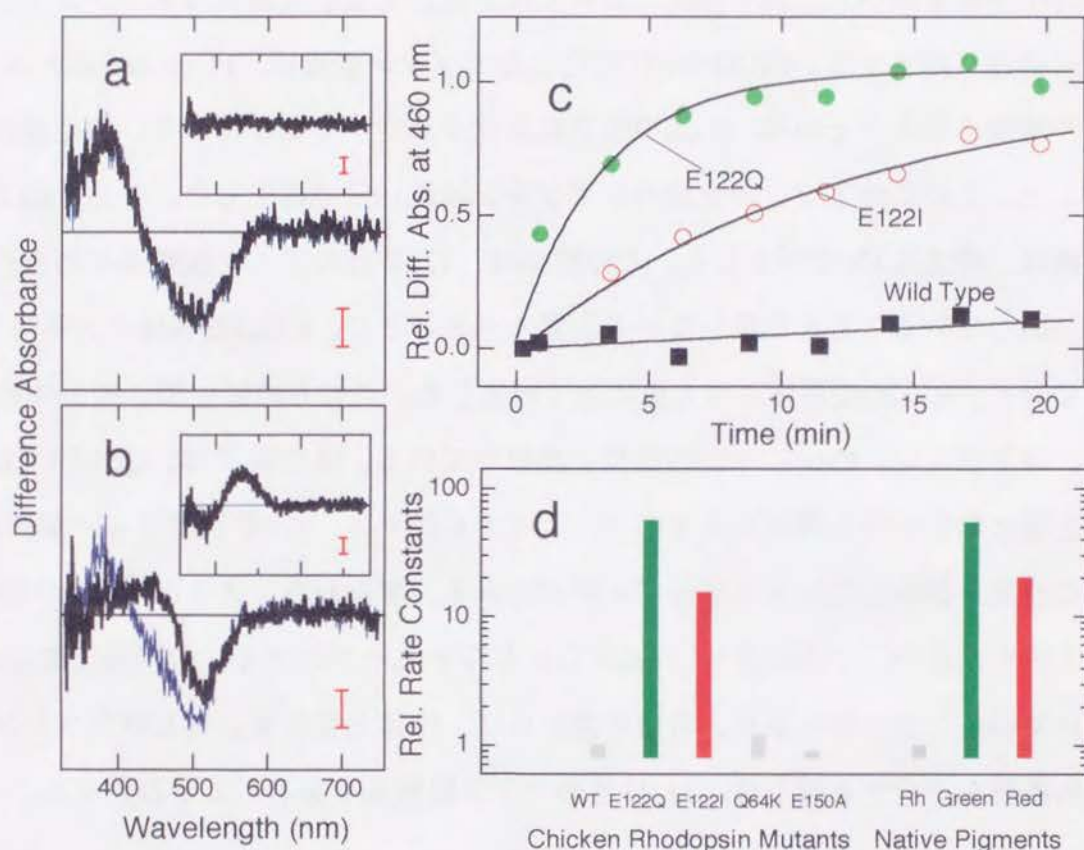


図 4-4 部位特異的変異ロドプシンのメタII中間体の崩壊過程

(A, B) 吸収スペクトルの変化によってモニターしたメタII中間体の生成と崩壊過程。野性型 (A) またはE122Q変異体 (B) のロドプシン試料に、2℃で橙色光 (> 570 nm) で30秒間光照射し、この温度で、暗保した。細い曲線と、太い曲線は、それぞれ照射直後と照射20分後の吸収スペクトルから照射前のスペクトルを引いた差スペクトルを表している。内挿図には、照射20分後の吸収スペクトルから照射直後のスペクトルを引いた差スペクトルを示した。スケールバーは、0.002OD unitを表している。(C) 野性型、E122Q変異体、E122I変異体のメタII中間体からメタIII中間体への遷移過程。それぞれのメタIII中間体の生成過程を、460 nmの吸光度の時間変化によりモニターした。黒色の曲線は、それぞれのデータを指数関数で近似した曲線を表す。それぞれの反応の時定数は、野性型が190分、E122Q変異体が3.3分、E122I変異体が12分であった。(D) 野性型、E122Q変異体、E122I変異体のメタII中間体の崩壊速度。野性型の速度定数に対する各変異体の速度定数の比を、対数プロットで示した。右側には、実際のGreen、Redのロドプシンに対する速度定数の比を示した。

4-3-4 部位特異的変異ロドプシンの再生速度

次にもう一つの、錐体光受容蛋白質とロドプシンの間で性質の大きな違いが見られる再生速度を調べた。再生速度においては、錐体光受容蛋白質はロドプシンよりも数百倍速く再生する。CHAPSで可溶化したオプシン溶液に、11-cis-retinalのエタノール溶液を加え、その後530 nmの吸光度変化を測定することにより、再生速度を測定した。この条件下で、野生型のロドプシンは数10分で再生した。一方、E122Q変異体は、時定数2分で再生した。この結果は、122番目のアミノ酸残基が再生の速度を制御していることを示唆している。驚くべきことに、E122I変異体は、野生型ばかりでなく、E122Q変異体よりも更に速く再生した。これらの野生型、変異体の関係は、ロドプシン、Green、Redの関係と酷似している。他の変異体、Q64KとE150Aは野生型と類似の再生速度を示すので、ここでも我々は、122番目のアミノ酸残基が再生の速度を制御していると推論する事が出来る。すなわち、メタII中間体の崩壊速度と再生速度の二つの性質が、122番目に存在する一つのアミノ酸残基によって制御されていることがわかった。言葉を変えれば、錐体光受容蛋白質とロドプシンの生理的性質を決定する因子は、122番目のアミノ酸残基であることがわかった。

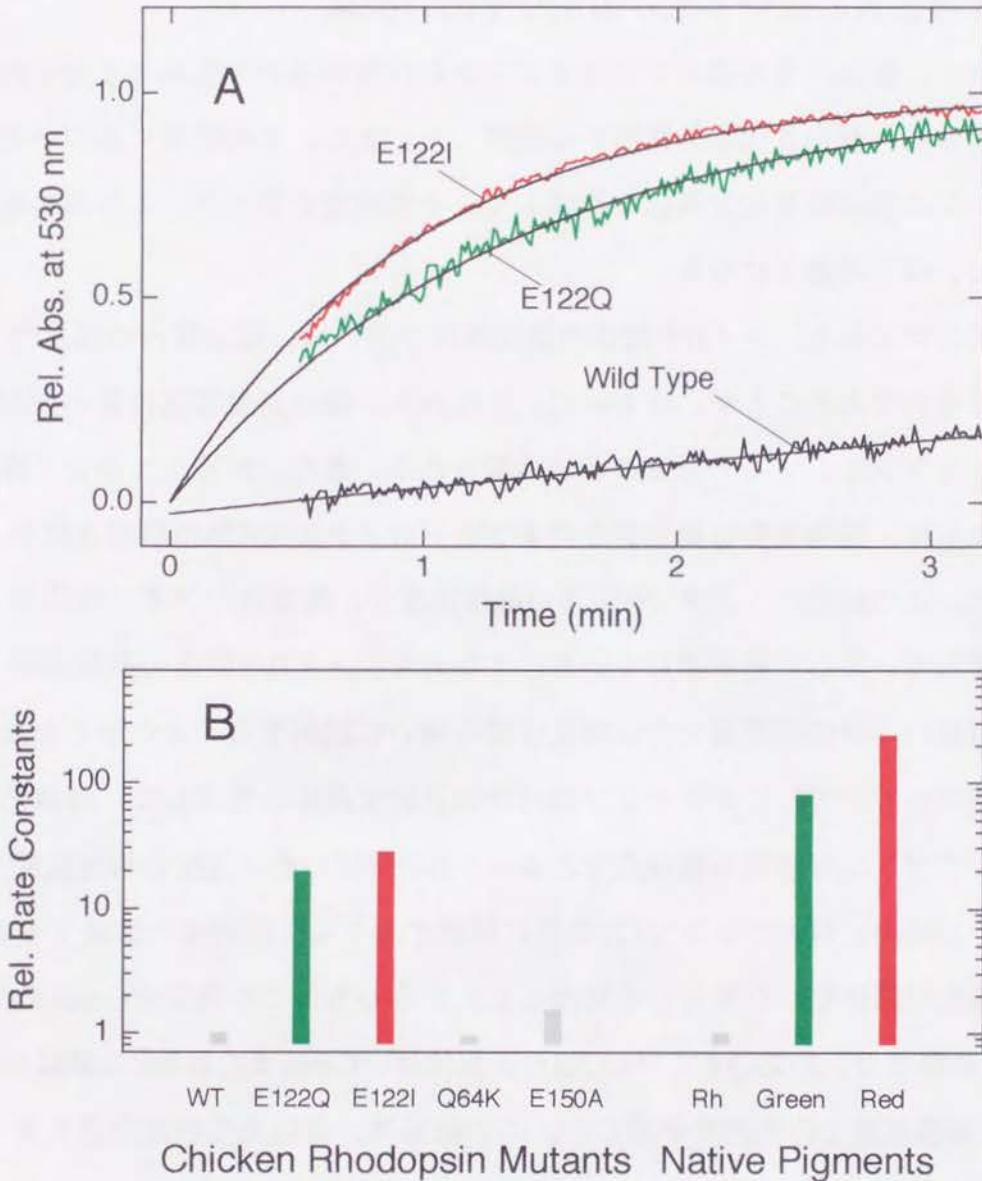


図4-5 部位特異的変異ロドプシンの再生速度

(A) 野性型、E122Q変異体、E122I変異体の再生速度。それぞれの光受容蛋白質のオプシン溶液 200 μ Lに、5 μ Lの11-cis-retinalのエタノール溶液 (500 μ M) を2 $^{\circ}$ Cで加えて、すばやく攪拌した。その後、試料の温度を2 $^{\circ}$ Cに保ったままで、光受容蛋白質を完全に再生させ、それぞれの再生の過程を、530 nmの吸光度の時間変化によりモニターした。図には、光受容蛋白質が完全に再生したときの最大の吸光度の値を1として、規格化した値を示してある。黒色の曲線は、それぞれのデータを指数関数で近似した曲線を表す。それぞれの反応の時定数は、野性型が26分、E122Q変異体が1.3分、E122I変異体が0.94分であった。(B) 野性型、E122Q変異体、E122I変異体の再生速度。野性型の速度定数に対する各変異体の速度定数の比を、対数プロットで示した。右側には、実際のGreen、Redのロドプシンに対する速度定数の比を示した。

4-4 両者の性質の違いを生み出す分子内の機構

本章では、まず、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いを生み出す分子内の機構を、熱力学的、蛋白質化学的側面から検討した。また、その結果に基づいて、実際にロドプシンの部位特異的変異体を作成して、その性質を調べた。これらの結果をまとめると、以下の通りになる。

熱力学的な解析によると、メタII中間体の崩壊速度の違いは、蛋白質内の相互作用の違いによるものであることが示唆された。すなわち、錐体光受容蛋白質の方がロドプシンよりもフレキシブルであることが示唆される。また、溶液をアルカリ性にすることによって、錐体光受容蛋白質とロドプシンのメタII中間体の崩壊速度が同程度になった。この結果は、メタII中間体の崩壊速度が、解離性のアミノ酸残基によって制御されていることを示唆している。すなわち、メタII中間体の崩壊速度の違いは、蛋白質内の解離性残基を含む相互作用の違いに起因することが示された。この推論に基づいて、実際にロドプシンの部位特異的変異体を作成して、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の相違点であるメタII中間体の崩壊速度と再生速度を検討した。その結果、ロドプシンで122番目に位置するアミノ酸残基を改変すると、ロドプシンの性質が錐体型になることを見出した。すなわち、この残基をGreenまたはRedにそれぞれ似せた、E122QまたはE122Iの変異体は、GreenまたはRedに類似のメタII中間体の崩壊速度と再生速度を示した。この結果は、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いが、この残基によって制御されていることを示している。

次章では、これらの光受容蛋白質の性質の違いは、実際に視細胞の性質にどのように影響を与えているのか、また、122番目のアミノ酸残基は分子内でどのように働いているのかを考察する。そして、視覚の二元説の分子基礎が、実際に光受容蛋白質のレベルに存在するのかを検討する。

第五章

光受容蛋白質の機能発現機構

本研究では、網膜から調製した錐体光受容蛋白質、特に緑色感受性光受容蛋白質の性質を、様々な側面から詳細に検討した。また、溶液のpHの効果、部位特異的変異ロドプシンを用いた解析などにより、その性質の発現機構について検討した。この章では、その結果について、総合的に考察してゆきたい。

5-1 光受容蛋白質の性質と視細胞の特性の関係

第三章に記述したように、Greenを含めた錐体光受容蛋白質の機能発現の速度は、ロドプシンに比べて速いことが示された。この項では、これらが視細胞の応答特性に与える影響について、考察してみたい。

5-1-1 再生速度と順応過程の相関

まず、再生反応であるが、この速さは視細胞の暗順応（光化学的暗順応）の過程に反映されていることがわかっている。暗順応とは、明るいところから暗いところへ移った時に、感度が上がって最初は見えなかったものが見えるようになる現象である。光化学的暗順応の過程では、視細胞の感度は光受容蛋白質の量によく対応することが知られている（Dowling and Wald, 1958; Rushton, 1961）。すなわちこの過程では、光によって退色した光受容蛋白質のオプシンが、再生して再び光受容能をもつことによって暗順応できるのである。また、もう一つの可能性は、合成されたオプシンに11-cis-retinalが結合して、光受容能をもつことにより暗順応する。いずれにせよ、暗順応の速さは再生の速さに相関する。そして、暗順応の速さは錐体のほうが桿体にくらべて格段に速いこと、および、アイオドプシンの再生はそれに対応してロドプシンよりも速いことがわかっていた（Wald et al., 1955）。

3-1の結果によってGreenの再生速度はアイオドプシンなみに速く、ロドプシンと大きな差があることがわかった。また、中間体の崩壊が速いことから、退色してから再生するまでの全体の時間、いわば、光受容能回復時間が、ロドプシンに比べてさらに速い。アイオドプシンとGreenが共にこういった傾向を示すことから、この結果は、多くの錐体光受容蛋白質の再生がロドプシンに比べて格段に速いことを示唆している。錐体光受容蛋白質は光量が多い環境で働くので、光を吸収して退色し

た後、すぐにもとの状態に戻らなければ、つぎつぎに入射する光子に対応することができない。すなわち、再生が速くなければならないため、この性質を保持するような構造がとられていると考えることができる。一方、ロドプシンは薄暗い環境で働くため、このような速い再生という性質を持つ必要がないと考えられる。

5-1-2 活性化光受容蛋白質の寿命と視細胞の光感受性の相関

一方、メタII中間体の崩壊速度は、光情報の細胞内伝達効率に、最も密接な関係がある。ロドプシンのトランスデューシンを活性化する状態を、活性化ロドプシンとよぶが、現在では、メタII中間体が活性化ロドプシンに相当することが知られている。錐体光受容蛋白質もトランスデューシンを活性化することが報告されているので、同様のメカニズムが考えられる。活性化光受容蛋白質の寿命は、光受容蛋白質に内在性の寿命すなわちメタII中間体の寿命と、ロドプシンキナーゼやアレスチン等の外在性の制御機構に由来する寿命によって決定される。外在性の制御機構については、錐体でも桿体と同様の機能性蛋白質が存在することが最近明らかになったが、その性質はまだ明確ではない。一方、本研究の結果では、内在性のメタII中間体の寿命において、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の間に違いが見出された。どちらの寿命が律速段階かは今後の研究課題であるが、視細胞内では、これらの機構がうまくかみ合っているであろう。そこでこの項では、活性化光受容蛋白質の寿命が、視細胞の応答特性に与える影響を考察したい。

活性化光受容蛋白質の寿命は、トランスデューシンを活性化する量と時間を規定する。実際、ロドプシンと錐体光受容蛋白質では、トランスデューシンを活性化する能力の、持続時間が異なる（図5-1）。寿命が長ければ活性化するトランスデューシンの量は多くなり、また、活性化時間も長引く。活性化したトランスデューシンが多くなれば、活性化するPDEの量が増加し、より多くのcGMPを分解することによって、閉じるcGMP依存性チャンネルの数を増やす。一方、トランスデューシンの活性化時間が長くなれば、活性化したPDEの存在時間も長くなり、これも多くのcGMPを分解することに寄与する。結果的に、活性化光受容蛋白質の寿命は、トランスデューシンを活性化する量と時間を通じて、視細胞の感受性を規定することになる。この、視細胞の光感受性との関係において、錐体光受容蛋白質とロドプシンのメタIIの寿命と、錐体と桿体の応答特性とは、質的により一致を示す。また量比においても、ロドプシンのメタIIの寿命が錐体光受容蛋白質よりも数十倍長いことは、桿体の光感受性が錐体よりも約百倍高いことに対応している。

最近では、ロドプシンの出現は、錐体光受容蛋白質の分化よりも遅いとする説が有力である (Okano et al., 1992a)。この説にのっとれば、ロドプシンは視細胞の光感受性を高めるために、再生速度を犠牲にして、メタIIの寿命を長くしたというべきなのであろうか。今後、内在性のメタIIの寿命の変化と、外在性の制御機構の出現時期との関係を明らかにすることによって、視細胞内の精緻な情報伝達制御機構の本質にせまることができると期待される。

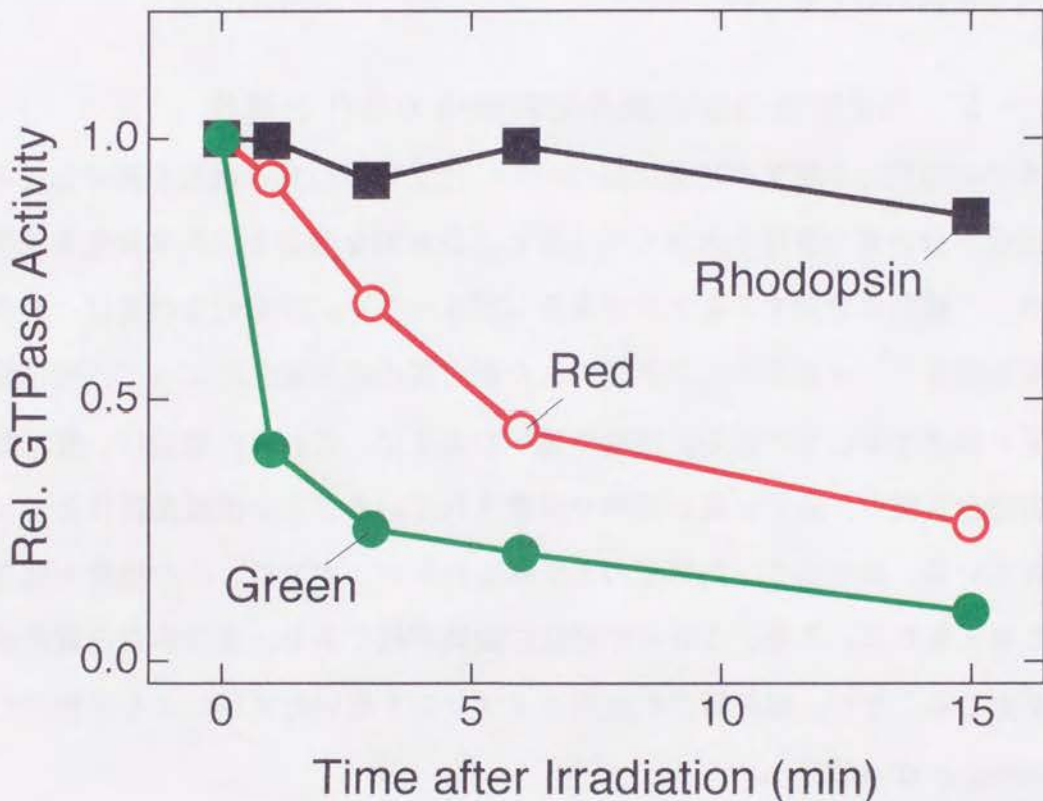


図5-1 トランスデューシンを活性化する能力におけるロドプシンと錐体光受容蛋白質の違い

トランスデューシンを活性化する能力の時間変化を、活性化したトランスデューシンが持つGTPase活性を指標に測定した。ロドプシン、Green、Red (170 nM) をそれぞれ4℃で30秒間光照射し、一定時間後に各30 μ Lを反応溶液20 μ Lに加えて最終的な体積を50 μ L (buf Pm、光受容蛋白質0.1 μ M、トランスデューシン1.5 μ M、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 2.4 μ M) とした。この反応溶液を25℃で2分間静置し、その時のGTPase活性を、遊離する $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ を指標に測定した。光照射していない試料の活性をベースラインとし、あらかじめ光受容蛋白質を反応溶液に加えて照射したときの活性を1として、活性の時間変化を示した。

5-2 光受容蛋白質の分子内機能発現機構

第四章に記述したように、錐体光受容蛋白質とロドプシンの性質の違いは、122番目のアミノ酸残基を含む、分子内の相互作用によって規定されることが明らかになった。最後に、このアミノ酸残基が、光受容蛋白質の機能発現機構内で、どのように位置づけられるのか検討したい。また、今後この残基が分子内で実際にどのように働いているのか解明するために、基礎となるこれまでの知見と、筆者の予測を記述して本論文を締めくくりたい。

5-2-1 光受容蛋白質の機能発現機構の分化と進化

これまでの知見と本論文の結果に基づいて、光受容蛋白質の機能を再考してみた。まず、光受容蛋白質の機能を大きく分けると、基本的な機能と、基本機能を制御する機能の、二種類に分類することができる（図5-2）。基本的な機能は、発色団で光情報を受容し、その異性化に誘起された蛋白質の構造変化によって、光情報をG蛋白質に伝達することである。序論で述べたように、これらの機能は、脊椎動物の光受容蛋白質間で、非常に高い確率で保存されているアミノ酸残基群によって、発現されている。おそらく、先祖型の光受容蛋白質が、すでに、この機能を確立していたと考えられる。また、これらの部位に変異が起こると、光受容蛋白質の機能に異常が生じることが、部位特異的変異ロドプシンを用いた実験により示されている（Robinson et al., 1992）。

それに対して、一つの分化した機能として、吸収スペクトルの分化が挙げられる。錐体光受容蛋白質には、吸収スペクトルの異なるいくつかの種類が存在する。この吸収スペクトルの多様性は、発色団周辺のアミノ酸残基の違いによってもたらされている。今まで多くの研究者が、この機構をアミノ酸残基のレベルで解明してきたが、現在では、確かに発色団周辺のアミノ酸残基の違いで、吸収スペクトルの分化が説明できることがわかってきている（Merbs & Nathans, 1992; Asenjo et al., 1994）。これらのアミノ酸残基の置換は、基本機能には致命的ダメージを与えないので、多様性の幅は非常に広い。また、生理学的には、この、吸収スペクトルの違

いは、色覚の分子基礎となっている。

一方、本研究で注目してきた122番目のアミノ酸残基は、光情報を受け取る発色団と、G蛋白質との相互作用部位を結ぶ部分に位置する。この位置と、その役割を考慮すると、この残基を含む部分は、情報伝達の効率を制御する部位であると名付けることができるであろう。この部位の機能中心は122番目のアミノ酸残基であり、この残基一つの違いで、分子内の情報伝達の効率がロドプシン型か錐体光受容蛋白質型かに規定される。すなわち、桿体と錐体の光受容蛋白質の分化は、一つのアミノ酸残基によって行われる。ロドプシンが錐体光受容蛋白質から進化したという説にのっとれば、122番目の位置にグルタミン酸をおくことにより、ロドプシンは光の情報をよく増幅する機能を獲得したといえることができるであろう。一方、錐体光受容蛋白質は、この位置に非解離性のアミノ酸残基を配位することにより、増幅能を犠牲にして、高速の再生能を保っているのではなかろうか。

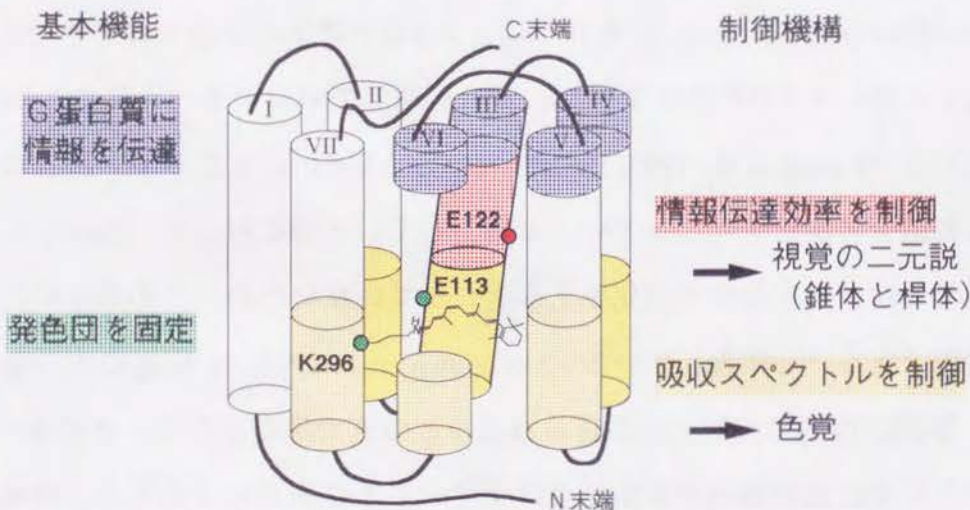


図5-2 光受容蛋白質の機能発現機構のモデル

光受容蛋白質の様々な機能は、特定の部位によって担われている。基本的な機能である発色団結合（緑）、G蛋白質トランスデュースンとの相互作用（青）は、脊椎動物の光受容蛋白質間で、非常に高い確率で保存されているアミノ酸残基群に担われている。また、色覚の分子基礎となる吸収スペクトルの多様性は、発色団周辺の、主に親水性のアミノ酸残基（黄）によって分化されている。これらの機能に加えて、本論文で見いだされた122番目のアミノ酸残基は、情報の伝達効率を制御することにより、視覚の二元説の分子基礎を形成している（赤）。

5-2-2 今後の展望

「なぜ、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の機能発現速度は異なるのか」

122番目のアミノ酸残基が、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の性質を決めていることはわかったが、それではこの残基がどのように分子の性質を決めているのであろうか。今後の課題として、この残基が分子内でどのように働いているのかということとを問題にするために、基礎となるこれまでの知見をもとに、いくつかの可能性を示したい。

まず、122番目のアミノ酸残基はどのような状態にあるのであろうか。錐体光受容蛋白質のアミノ酸残基は非解離性であるが、ロドプシンではここが解離性のグルタミン酸である。そこで当然、ロドプシンのこの残基が解離して、負電荷を持っていることが重要なのではないかと予想される。ところが、この部位は疎水的な膜貫通部分にあるため、光受容前のロドプシンの状態では、このグルタミン酸E122は解離していない (Fahmy et al., 1993)。それでは、メタII中間体の状態ではどうであろうか？現在のところ、メタII中間体でも、E122は解離していないという二つの報告が提出されている (Fahmy et al., 1993; DeCaluwe et al., 1995)。ところが、前者は、この残基に水素結合の変化が起こっていると報告しているのに対して (Fahmy et al., 1993)、後者では、水素結合の変化さえも起こっていないため、この残基に由来する変化は観測できないと報告している (DeCaluwe et al., 1995)。両者の実験条件は、溶液のpH、界面活性剤の有無、膜脂質の組成などの点で異なるため、その不一致の原因は、おそらくE122が環境の影響を受けやすいことにあるのであろう。疎水的な膜貫通部分に存在するE122が、環境の影響を受けやすいことを考慮すると、今後、解離の可能性も含めて、この残基の状態について、さらに詳細な検討が必要であろう。

一方、122番目のアミノ酸残基が機能するためには、単独では機能できず、何らかの相互作用がなければならない。実際、熱力学的な解析によると、蛋白質内外の相互作用が、メタII中間体の安定性を制御していることが示されている。その方式と

しては、電氣的なもの、疎水的なもの、蛋白質全体の水素結合の変化、あるいはペプチド主鎖の骨格変化など、様々なものが列挙できる。現段階では、このうちの特定の形式に、その原因を求めることは難しい。今後、様々な条件で、様々な変異体の性質を検討してゆくことにより、そのメカニズムを特定できるようにしてゆかなければならない。ただ、一つ確かなことは、ロドプシンのE122が錐体光受容蛋白質の非解離性のアミノ酸残基とは異なり、負電荷を持つ可能性があるということである。ロドプシンでは、メタIIの生成とともに、蛋白質外部からプロトンが入り、蛋白質内に正電荷が増えることが示されている (Arnis & Hoffman, 1993)。この残基は、5番目の膜貫通領域に存在するヒスチジン残基であるH211であるという報告もある (Weitz & Nathans, 1992)。E122の負電荷と、H211の正電荷が電氣的に相互作用するようなモデルは、非常に単純であり、一つの魅力的な考え方でもある。この電荷の対により、ロドプシンのメタII、オプシンは安定化されていると考えれば、pHによる反応速度の変化も説明がつく。一方、錐体光受容蛋白質ではこの電荷対がないために、ロドプシンよりも反応が速いと想像できる。今後は、この仮説の検証が一つの研究課題となってゆくであろう。

興味深いことに、このH211は、ロドプシンとGreenにしか存在しない。このことは、なぜロドプシンがGreenタイプの錐体から進化したかを考える上で興味深い。すなわち、GreenがH211を持っていたので、この蛋白質の一つのアミノ酸残基E122が置換することによって、ロドプシンが進化したのであると考えることはできないであろうか。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々のお世話になりました。ここに深く感謝の意を表したいと思います。

七田芳則助教授には、指導教官として、研究全般にわたり懇切丁寧に御指導していただきました。深くお礼を申し上げたいと思います。今元 泰博士には、実際の実験操作について一から教えていただき、また、研究を共にすすめていただきました。改めてお礼を申し上げたいと思います。寺北明久博士には、生化学的、分子生物学的な実験について、助言をいただきました。また、小島大輔博士、大浦智紀氏には、ロドプシン変異体の調製について御指導、御協力していただきました。データの解析については、水上 卓博士に有益な助言をいただきました。岡田哲二博士、水上なおみ氏、橋木修志氏、そして研究室の皆さんには試料の調製をはじめとした様々な面でお世話になりました。

東京大学の深田研の皆様にも、試料の調製や、セミナーでの議論を通じてお世話になりました。なかでも岡野俊行博士には、錐体光受容蛋白質の精製、一次構造について多くの助言を頂きました。深田吉孝教授には、特に生化学的な見地から様々な示唆に富んだ御助言を頂きました。さらに、大阪大学の久富 修博士、徳永史生教授には、培養細胞におけるロドプシンの発現系について、試料の提供と技術的な御協力をいただきました。

最後に、セミナーの席などで、有益な議論をしていただきました前田章夫教授、神取秀樹博士にお礼を申し上げたいと思います。また、吉澤透大阪産業大学教授にはおりにふれて様々なご助言を頂き、また、激励していただきました。新鮮な研究材料を供給して下さった株式会社鳥ぴん様、六美養鶏組合様、静岡イチレイ様を含め、皆様に改めてお礼を申し上げます。

参考文献

- Asenjo, A.B., Rim, J., & Oprian, D.D. (1994) *Neuron* **12**, 1131-1138.
- Arnis, S., & Hofmann, K. P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7849-7853.
- Bennet, N., Michel-Villaz, M., & Kuhn, H. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**, 97-103.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R. S., & Kaupp, U. B. (1993) *Neuron* **10**, 865-877.
- Dartnall, H. J. A. (1967) *Vision Res.* **8**, 339-358.
- DeCaluwe, G. L. J., Bovee-Geurts, P. H. M., Rath, P., Rothschild, K. J., & DeGrip, W. J. (1995) *Biophysical Chemistry* **56**, 79-87.
- Dowling, J. E., & Wald, G. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 648.
- Eyring, G., Curry, B., Broek, A., Lugtenburg, J., & Mathies, R. (1982) *Biochemistry* **21**, 384-393.
- Fahmy, K., Jäger, F., Beck, M., Zvyaga, T. A., Sakmar, T. P., & Siebert, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10206-10210.
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., & Lyubarsky, A. L. (1985) *Nature* **313**, 310-313.
- Freedman, K. & Becker, R. S. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1245-1251.
- Fukada, Y., & Yoshizawa, T. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 195-200.
- Fukada, Y., Okano, T., Artamonov, I. D., & Yoshizawa, T. (1989) *FEBS Lett.* **246**, 69-72.
- Fukada, Y., Kokame, K., Okano, T., Shichida, Y., Yoshizawa, T., McDowell, J. H., Hargrave, P. A., & Palczewski, K. (1990) *Biochemistry* **29**, 10102-10106.
- Fung, B. K., Hurley, J. B., & Stryer, L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 152-156.
- Gillespie, P. G., & Beavo, J. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8133-8141.
- Gorman, C. M., Gies, D. R., & McCray, G. (1990) *DNA and Protein Engineering Techniques* **2**, 3-10.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S.-L., Mohanna Rao, J. K., & Argos, P. (1983) *Biophys. Struct. Mech.* **9**, 235-244.
- Haynes L. W., & Yau, K.-W. (1985) *Nature* **317**, 61-64.

- Horiuchi, S., Tokunaga, F., & Yoshizawa, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 445-457.
- Hubbard, R. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4662.
- Hubbard, R., Brown, P. K., & Kropf, A. (1959) *Nature* **183**, 442-446.
- Imai, H., Mizukami, T., Imamoto, Y., & Shichida, Y. (1994) *Biochemistry* **33**, 14351-14358.
- Imai, H., Imamoto, Y., Yoshizawa, T., & Shichida, Y. (1995) *Biochemistry* **34**, 10525-10531.
- Imamoto, Y., Kandori, H., Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1989) *Biochemistry* **28**, 9412-9416.
- Kayada, S., Hisatomi, O., & Tokunaga, F. (1995) *Comp. Biochem. Physiol.* **110**, 599-604.
- Kibelbek, J., Mitchell, D. C., Beach, J. M., & Litman, B. J. (1991) *Biochemistry* **30**, 6761-6768.
- Kojima, D., Imai, H., Okano, T., Fukada, Y., Crescitelli, F., Yoshizawa, T., & Shichida, Y. (1995) *Biochemistry* **34**, 1096-1106.
- Kojima, D., Oura, T., Hisatomi, O., Tokunaga, F., Fukada, Y., Yoshizawa, T., & Shichida, Y. (1996) *Biochemistry in press*.
- Konig, B., Arendt, A., McDowell, J. H., Kahlert, M., Hargrave, P. A., & Hofmann, K. P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6878-6882.
- Koyama, Y., Kubo, K., Komori, M., Yasuda, H., & Mukai, Y. (1991) *Photochem. Photobiol.* **54**, 433-443.
- Kropf, A. & Hubbard, R. (1970) *Photochem. Photobiol.* **12**, 249-260.
- Kühn, H. (1984) in *Progress in Retinal Research 3* (Osborne, N., and Chader, G. Eds.) pp. 123-156, Pergamon Press, Oxford.
- Kuwata, O., Imamoto, Y., Okano, T., Kokame, K., Kojima, D., Matsumoto, H., Morodome, A., Fukada, Y., Shichida, Y., Yasuda, K., Shimura, Y., & Yoshizawa, T. (1990) *FEBS Lett.* **272**, 128-132.
- Lerea, C. L., Somers, D. E., Hurley, J. B., Klock, I. B., & Bunt-Milam, A. H. (1986) *Science* **234**, 77-80.
- Li, T., Volpp, K., & Applebury, M. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 293-297.
- Maeda, A., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1978a) *J. Biochem.* **83**, 661-663.

- Maeda, A., Ogurusu, T., Shichida, Y., Tokunaga, F., & Yoshizawa, T. (1978b) *FEBS lett.* **92**, 77-80.
- Matthews, R. G., Hubbard, R., Brown, P. K., & Wald, G. (1963) *J. Gen. Physiol.* **47**, 215-240.
- Merbs, S. L., & Nathans, J. (1992) *Nature* **356**, 433-435.
- Nathans, J., Thomas, D., & Hogness, D.S. (1986) *Science* **232**, 193-202.
- Nathans, J. (1990a) *Biochemistry* **29**, 937-942.
- Nathans, J. (1990b) *Biochemistry* **29**, 9746-9752.
- Okada, T., Kandori, H., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Denny, M., Zhang, B. W., Asato, A. E., & Liu, R. S. H. (1991) *Biochemistry* **30**, 4796-4802.
- Okada, T., Matsuda, T., Kandori, H., Fukada, Y., Yoshizawa, T., & Shichida, Y. (1994) *Biochemistry* **33**, 4940-4946.
- Okano, T., Fukada, Y., Artamonov, I. D., & Yoshizawa, T. (1989) *Biochemistry* **28**, 8848-8856.
- Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1992a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5932-5936.
- Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1992b) *Photochem. Photobiol.* **56**, 995-1001.
- Ong, O. C., Yamane, H. K., Phan, K. B., Fong, H. K. W., Bok, D., Lee, R. H., & Fung, K.-K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8495-8500.
- Palczewski, K., McDowell, J. H., & Hargrave, P. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14067-14073.
- Picones, A., & Korenbrot, J. I. (1995) *Biophys. J.* **69**, 120-127.
- Pugh, E. N. J., & Cobbs, W. H. (1986) *Vision Res.* **26**, 1613-1643.
- Robinson, P. R., Cohen, G. B., Zhukovsky, E. A., & Oprian, D. D. (1992) *Neuron* **9**, 719-725.
- Rushton, W. A. H. (1961) *J. Physiol.* **156**, 193.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R., & Khorana, H. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8309-8313.

- Schertler, G. F. X., Villa, C., & Henderson, R. (1993) *Nature* **362**, 770-772.
- Schnapf, J., & Baylor, D. A. (1986) *Scientific American* **256**, 32-39.
- Shichida, Y., Matuoka, S., & Yoshizawa, T. (1984) *Photochem. Photobiol.* **7**, 221-228.
- Shichida, Y., Taniguchi, Y., Kuwata, O., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Horiuchi, S., & Takeichi, M. (1989) *Exp. Eye Res.* **48**, 281-293.
- Shichida, Y., Okada, T., Kandori, H., Fukada, Y., & Yoshizawa, T. (1993) *Biochemistry* **32**, 10832-10838.
- Shichida, Y., Imai, H., Imamoto, Y., Fukada, Y., & Yoshizawa, T. (1994) *Biochemistry* **33**, 9040-9044.
- Takao, M., Yasui, A., & Tokunaga, F. (1988) *Vision Res.* **28**, 471-480.
- Wald, G., & Brown, P. K. (1953) *J. Gen. Physiol.* **37**, 189-200.
- Wald, G., Brown, P. K., & Smith, P. H. (1955) *J. Gen. Physiol.* **38**, 623-681.
- Wang, S.-Z., Adler, R., & Nathans, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 3309-3315.
- Weitz, C. J., & Nathans, J. (1992) *Neuron* **8**, 465-472.
- Yau, K.-W. (1994) *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.* **35**, 9-32.
- Yen, L., & Fager, R. S. (1984) *Vision Res.* **24**, 1555-1562.
- Yoshizawa, T., & Kitô, Y. (1958) *Nature* **182**, 1604-1605.
- Yoshizawa, T., & Wald, G. (1963) *Nature* **197**, 1279-1286.
- Yoshizawa, T., & Wald, G. (1967) *Nature* **214**, 556-571.
- Yoshizawa, T., & Shichida, Y. (1982) *Methods in Enzymol.* **81**, 333-354.
- Zhukovsky, E. A., & Oprian, D. D. (1989) *Science* **246**, 928-930.
- 岡野俊行、七田芳則 (1992c) *生物物理* **32**, 41-44.
- 吉澤 透、岡野俊行 (1990) *ビタミン* **64**, 614-615.
- 吉澤 透、今元 泰 (1992) *実験医学* **10**, 204-211.